

Ana Maria de Figueiredo Valado

# MARCADORES BIOLÓGICOS NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: RELEVÂNCIA NO PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

Tese de doutoramento em Biotecnologia, ramo de especialização em Biologia Celular e Molecular, orientada pela Doutora Inês Baldeiras, pelo Professor Doutor António Moreno, e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Maria de Figueiredo Valado

**MARCADORES BIOLÓGICOS NA ESCLEROSE MÚLTIPLA:  
RELEVÂNCIA NO PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA**

Tese de doutoramento em Biociências, ramo de especialização em Biologia Celular e Molecular, orientada pela Doutora Inês Baldeiras e pelo Professor Doutor António Moreno, apresentada ao Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Aos meus Pais e Irmã

À Mariana

Ao Leonel



Este trabalho foi apoiado pela Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) - SFRH/PROTEC/67690/2010 e pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra (ESTeSC).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
E CIÊNCIA





## **Agradecimentos**

A elaboração da presente dissertação foi, sem dúvida, o desafio mais importante, mas igualmente o mais trabalhoso e exigente do meu percurso profissional. E porque a sua conclusão não dependeu exclusivamente de mim, agradeço todo o apoio, força e incentivo manifestados ao longo desta caminhada.

A todos o meu muito Obrigada!

À Doutora Inês Baldeiras, minha orientadora científica, pelos seus inestimáveis ensinamentos e rigor científico, colaboração nos trabalhos laboratoriais, persistência, acompanhamento e disponibilidade na correção e sugestões de melhoria da presente tese. Agradeço-lhe toda a amizade, dedicação e confiança depositada em mim permitindo a conclusão desta obra, o meu muito Obrigada!

Ao Professor Doutor António Moreno, orientador científico desta dissertação pelos seus saberes e ensinamentos científicos e metodológicos, disponibilidade, paciência e todo o apoio, muito obrigada.

A todos os doentes de esclerose múltipla que voluntariamente integraram o estudo, fundamentais para a realização do trabalho, o meu muito obrigada!

Aos alunos, colegas e funcionários da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, às funcionárias do Centro de Assistência Paroquial de Pampilhosa e demais amigos, que livremente integraram os controlos saudáveis do presente estudo, bem como, o seu apoio e confiança.

À Dr.<sup>a</sup> Lúcia Sousa, por todo o seu auxílio e disponibilidade na transmissão dos seus conhecimentos e preciosa experiência, conselhos amigos e sobretudo o seu incentivo e força, o meu sincero obrigada!

À Doutora Sónia Batista e à Dr.<sup>a</sup> Inês Correia pelo seu saber, amizade e ajuda na seleção e caracterização dos doentes, uma mais-valia para a concretização do estudo.

Aos enfermeiros do serviço de Neurologia, hospital de dia, pela sua colaboração e ajuda nas colheitas.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neuroquímica Maria Helena Garrucho, Maria João Leitão, Lurdes Serralheiro e Rui Pascoal, obrigada pelas palavras amigas de ânimo e força, tão importantes para continuar e terminar a presente tese, bem como toda a colaboração nas tarefas laboratoriais.

Aos amigos do Laboratório de Genómica do Instituto Português do Sangue e Transplantação de Coimbra, em especial ao Dr. António Martinho e Ana Sofia Gonçalves pela amizade, confiança e disponibilidade dos equipamentos que permitiram a pesquisa do polimorfismo.

Ao Professor João Paulo Figueiredo, amigo inestimável na sua preciosa ajuda ao nível da estatística, disponibilidade, incentivo e coragem, Obrigada!

Aos colegas do Departamento de Ciências Biomédicas Laboratoriais, uma gratidão particular pela força e as palavras amigas, que nos momentos mais difíceis me encorajaram a caminhar. Em especial à Nádía Osório pela sua sempre disponível e valiosa ajuda na elaboração dos gráficos e ao Armando Caseiro, inestimável amigo pela sua dedicação e paciência na bibliografia, gráficos e formatação. Ao António Gabriel, companheiro de longa data, a nível profissional e académico, desejo sinceramente que muito em breve conclua a sua caminhada académica.

Aos familiares que me incentivaram e cedo perceberam a minha constante vontade em aprender e ir mais além, sempre me apoiaram e transmitiram coragem e força nas fases mais complicadas em que o fim parecia cada vez mais distante. Em especial à minha filha Mariana, exemplo de empenho, e persistência característicos da sua forte personalidade, sem dúvida o meu maior orgulho! Ao Leonel por todo o seu incentivo, carinho e peculiar dedicação na elaboração da figura da capa. Obrigada!

Ao meu saudoso Pai, um eterno Obrigada!

## **Resumo**

Esclerose múltipla (EM) é uma doença multifatorial, inflamatória, desmielinizante e neurodegenerativa, com interrupção da transmissão nervosa no SNC. De etiologia pouco conhecida, uma reação autoimune direcionada contra antígenos da substância branca e auto-reatividade de células imunes através da BHE, mostraram ser cruciais na formação das lesões inflamatórias. O curso clínico da doença é altamente incerto, associando formas clínicas surto-remissão (SR) com formas progressivas. A heterogeneidade clínica e fisiopatológica torna o prognóstico da EM um desafio.

O objetivo deste estudo foi tentar identificar marcadores biológicos que funcionassem como indicadores de prognóstico da EM. Para tal selecionaram-se marcadores que se sabe terem um papel essencial na inflamação do SNC: MMPs e seus inibidores (TIMPs), moléculas de adesão celular (CAMs), produção intratecal de imunoglobulinas (Ig). Estudaram-se amostras emparelhadas de LCR e soro de doentes de EM e controles neurológicos (CN: outras doenças inflamatórias-DI e não inflamatórias-DNI do SNC), onde se pesquisou a presença de bandas oligoclonais (BOC) IgG e IgM por focagem isoelétrica. Os níveis de MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Seleatina, foram determinados por ELISA. Recorrendo à metodologia PCR-RFLP, avaliou-se a presença do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 em doentes de EM e controles saudáveis (CS).

As BOC IgG pesquisaram-se em 183 doentes de EM e 76 CN, revelando um predomínio de IgG restritas ao LCR em 82,4%, nos doentes de EM e em 15,8% dos controles. Quanto à progressão da incapacidade no curso da EM, avaliada pela escala de EDSS, revelou-se significativamente superior após o primeiro ano de EM nos doentes com BOC IgG positivas. Porém, esta tendência inverteu-se ao longo da doença, e numa avaliação superior a 10 anos de EM, os valores de EDSS tornaram-se significativamente superiores nos doentes sem BOC IgG, apresentando também valores superiores e significativos no último EDSS, uma maior probabilidade de atingirem um valor de EDSS×4 após 10 anos de EM ou de alguma vez, durante o curso da EM, atingirem um EDSS×6. Observaram-se também diferenças significativas em relação aos subtipos, com os doentes na forma primária progressiva a mostrarem uma percentagem menor de BOC IgG positivas, e às

terapêuticas instituídas, com os doentes sem BOC IgG a registarem maior necessidade de recorrer a terapia de 2ª linha. Relativamente às BOC IgM (pesquisadas em 115 doentes de EM e 69 CN), apenas 16,5% nos doentes de EM revelaram a presença de BOC IgM restritas ao LCR, sem diferença significativa face aos controlos. Os doentes de EM com BOC IgM positivas evidenciaram, à data da PL, um EDSS significativamente superior e também uma maior probabilidade de atingirem alguma vez, ao longo da doença, um valor de EDSS $\times$ 6.

Os marcadores de disfunção da BHE foram avaliados num subgrupo de 51 doentes de EM, 21 DNI e 33 DI. Observou-se um aumento significativo nos níveis da MMP-2 sérica, da razão MMP-2/TIMP-2 no soro e LCR, da razão MMP-9/TIMP-1 no LCR e, ainda, uma redução significativa nos níveis do TIMP-2 sérico nos doentes de EM. Quanto às CAMs, observou-se um aumento significativo da sICAM-1 e sE-Selelina e uma redução da sVCAM-1 no LCR dos doentes de EM. Quanto à relação com a progressão da EM, o aumento da expressão da sVCAM-1 sérica revelou uma associação com níveis superiores de EDSS e formas progressivas da EM; enquanto um aumento da razão MMP-9/TIMP-1 sérica mostrou associar-se a menor incapacidade no curso da EM e ao fenótipo SR.

O estudo do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 realizou-se em 169 doentes de EM e 186 CS, sem diferenças significativas na distribuição entre doentes e controlos. Contudo, nos doentes e não nos controlos, registou-se um aumento significativo da frequência do alelo T no sexo feminino. Não se observou nenhuma associação entre a presença do polimorfismo -1562 C/T e a progressão da EM. Os níveis séricos da MMP-9 eram significativamente superiores nos doentes, não sendo influenciados pela presença do alelo T, ao contrário do observado nos CS, onde o alelo T estava associado ao aumento dos níveis da MMP-9. Registou-se ainda uma redução significativa nos níveis séricos da MMP-9 nos doentes a realizar terapia com IFN .

Os nossos resultados sugerem que alguns dos marcadores possam ter utilidade clínica no seguimento dos doentes de EM. A síntese intratecal de IgG e IgM parece ter efeito preditivo no curso da EM, com a ausência de IgG no LCR a apontar para um pior prognóstico a longo prazo e a presença de IgM a sugerir um prognóstico menos favorável a curto prazo. Também níveis elevados de sVCAM-1 séricos parecem sugerir um fenótipo mais agressivo, enquanto o aumento da razão MMP-9/TIMP-1 aparece associado a menor incapacidade ao longo da EM e poderá ser um bom marcador de resposta à terapêutica nos doentes tratados com o IFN .

**Palavras-chave:** EM; BOC IgG e IgM; MMPs; TIMPs; CAMs; BHE; prognóstico; LCR; polimorfismo -1562 C/T.



## **Abstract**

Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial, inflammatory, demyelinating and neurodegenerative disease, with interruption of nerve transmission in the central nervous system (CNS). Despite unknown aetiology, an autoimmune reaction directed against white matter antigens and self-reactivity of immune cells through the blood-brain barrier (BBB), have been shown to be crucial to the formation of inflammatory lesions. The clinical course of the disease is highly unpredictable, with both relapsing-remitting (RR) and progressive forms. The clinical and pathophysiological heterogeneity make MS prognosis very challenging.

The objective of this study was to identify biological markers that would act as prognostic markers of MS. Therefore, we selected markers known to play an essential role in CNS inflammation: matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs), cell adhesion molecules (CAMs), and the intrathecal production of immunoglobulins (Ig). Paired cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples from MS patients and neurological controls (NC: other inflammatory diseases-ID and non-inflammatory of the CNS-NID) were studied, and the presence of IgG and IgM oligoclonal bands (OCB) was assessed by isoelectric focusing. The levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, sICAM-1, sVCAM-1 and sE-Selectin were determined by ELISA. The presence of the -1562 C/T polymorphism of the MMP-9 gene was also evaluated in MS patients and healthy controls (HC), through PCR-RFLP methodology.

The presence of IgG-OCB was investigated in 183 MS patients and 76 controls (37-NID; 39-ID), showing a predominance of CSF restricted IgG-OCB in 82.4% of MS patients and in 15.8% of controls. Regarding the progression of disability in the course of MS, assessed through the EDSS scale, significantly increased levels were found after the first year of MS in IgG-OCB positive patients. However, this trend reversed over the disease course, and after 10 years or more of MS, EDSS values became significantly higher in patients without IgG-OCB, that also presented significantly higher values in the last EDSS, a higher probability of reaching an EDSS×4 after 10 years of MS or of reaching an EDSS×6 at any time during the course of MS. Significant differences were also observed regarding clinical subtypes, with patients in the progressive primary form

showing a lower percentage of positive IgG-OCB, and in relation to therapy, with patients without IgG-OCB being more likely to undergo second line therapy. In relation to IgM-OCB (investigated in 115 MS patients and 69 NC), 16.5% of MS patients showed CSF restricted IgM-OCB, with no significant difference in relation to controls. MS patients with positive IgM-OCB showed, at the time of LP, a significant higher EDSS score and also an increased probability of reaching an EDSS $\times$ 6 over the course of the disease.

BBB dysfunction markers were evaluated in a subgroup of 51 MS, 21 NID and 33 ID patients. A significant increase in serum MMP-2, serum and CSF MMP-2/TIMP-2 ratio, CSF MMP-9/TIMP-1 ratio, as well as a significant reduction in serum TIMP-2 levels was found in MS patients. Regarding CAMs, a significant increase of sICAM-1 and sE-Selectine and a reduction of sVCAM-1 in the CSF of MS patients was observed. Regarding the relation with the progression of MS, increased serum sVCAM-1 expression was associated with higher EDSS scores and progressive forms of MS; while an increase in the serum MMP-9/TIMP-1 ratio was associated with lower disability in the course of MS and the SR phenotype.

The study of the -1562 C/T polymorphism in the MMP-9 gene was performed in 169 patients with MS and 186 CS, showing no significant difference between patients and controls. However, in patients, but not in controls, an increase in the frequency of the T allele in females was found. There was no association between the presence of the -1562 C/T polymorphism and the progression of MS. Serum levels of MMP-9 were increased in MS patients and were not influenced by the presence of the T allele, contrary to what was shown in HC, where the T allele was associated with increased levels of MMP-9. There was also a significant reduction in serum MMP-9 levels in patients undergoing IFN therapy.

Our results suggest that some of the tested markers may have clinical utility in the follow-up of MS patients. The intrathecal synthesis of IgG and IgM seems to have a predictive value in the course of MS, with the absence of IgG-OCB in the CSF pointing towards a worse long term prognosis and the presence of IgM-OCB suggesting a less favourable prognosis in the short term. Also, elevated serum sVCAM-1 levels appear to be indicative of a more aggressive phenotype, while increased MMP-9/TIMP-1 ratio seems to be associated with decreased disability throughout MS and may be a good marker of response to therapy in patients treated with IFN .

**Keywords:** MS; IgG and IgM-OCB; MMPs; TIMPs; CAMs; BBB; prognosis; CSF; -  
1562 C/T polymorphism.



## **Publicações**

Parte do trabalho apresentado na tese já foi publicada em artigos em revistas de circulação internacional com arbitragem científica ou em congressos internacionais de esclerose múltipla.

Valado, A., M. J. Leitão, A. Martinho, R. Pascoal, J. Cerqueira, I. Correia, S. Batista, L. Sousa and I. Baldeiras (2017). "Multiple sclerosis: Association of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with risk and clinical course the disease." *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 11: 71-76.

Valado, A., T. Proença, J. Sargento-Freitas, S. Batista, L. Sousa, C. R. Oliveira and I. Baldeiras (2012). "Biomarkers of blood-brain barrier in the progression of multiple sclerosis." *Multiple Sclerosis Journal* 18: 262-263.

### **Comunicação oral**

Valado, A., M. H. Garrucho, J. Sargento-Freitas, S. Batista, L. Sousa, C. R. Oliveira and I. Baldeiras (2013). "Oligoclonal bands in multiple sclerosis disease course." *Second International Porto Congress on Multiple Sclerosis*. 25-26 January, Porto, Portugal.

### **Comunicação na forma de poster**

Valado, A., M. J. Leitão, A. Martinho, A. S. Gonçalves, J. Cerqueira, I. Correia, S. Batista, L. Sousa and I. Baldeiras (2015). "Polymorphism of MMP-9 gene in patients with multiple sclerosis." *Third International Porto Congress on Multiple Sclerosis*. 25-26 February, Porto, Portugal.

Valado, A., T. Proença, J. Sargento-Freitas, S. Batista, L. Sousa, C. R. Oliveira and I. Baldeiras (2011). "Blood-brain barrier disruption markers and disease progression in multiple sclerosis." *First International Porto Congress on Multiple Sclerosis*. 28-29 January, Porto, Portugal.



## **Índice**

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XIII</b>
<b>PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>XVII</b>
<b>ÍNDICE</b> .....	<b>XIX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>XXV</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XXVII</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Esclerose múltipla ó características gerais</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Breve resenha histórica .....	1
1.1.2 Epidemiologia .....	3
1.1.3 Etiologia/Fatores de risco .....	6
1.1.3.a Exposição solar/Vitamina D .....	6
1.1.3.b Hipótese vírica/hipótese de prevalência/hipótese higiênica .....	8
1.1.3.c Genética .....	11
<b>1.2 Fisiopatologia da esclerose múltipla</b> .....	<b>13</b>
1.2.1 Barreira hematoencefálica .....	15
1.2.2 Disrupção da barreira hematoencefálica .....	16
1.2.2.a Transmigração das células do sistema imune através da BHE .....	17
1.2.2.b Metaloproteinases da matriz e seus inibidores tecidulares .....	20
1.2.3 Imunopatologia: células T e B .....	24
1.2.4 Mecanismos de desmielinização e neurodegeneração .....	30
<b>1.3 Aspectos clínicos da esclerose múltipla</b> .....	<b>33</b>
1.3.1 Sintomas clínicos .....	34
1.3.2 Curso clínico .....	34
1.3.3 Diagnóstico .....	36

1.3.3.a Análise do líquido cefalorraquídeo .....	38
1.3.4 Prognóstico .....	40
1.3.5 Terapêutica.....	43
<b>1.4 Objetivos.....</b>	<b>48</b>
1.4.1 Objetivos gerais.....	48
1.4.2 Objetivos específicos.....	48
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>2.1 Seleção da população.....</b>	<b>51</b>
<b>2.2 Colheita e processamento das amostras .....</b>	<b>52</b>
<b>2.3 Pesquisa de imunoglobulinas (Ig) oligoclonais no soro e LCR.....</b>	<b>53</b>
2.3.1 Bandas oligoclonais de IgG .....	54
2.3.2 Bandas oligoclonais de IgM.....	55
<b>2.4 Marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica .....</b>	<b>59</b>
<b>2.5 Genotipagem do polimorfismo do gene da MMP-9.....</b>	<b>62</b>
<b>2.6 Análise estatística .....</b>	<b>63</b>
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
<b>3.1 Bandas oligoclonais no soro e líquido cefalorraquídeo .....</b>	<b>67</b>
3.1.1 Caracterização da amostra .....	67
3.1.2 Padrão de bandas oligoclonais IgG e IgM .....	68
3.1.3 Relação das bandas oligoclonais com a apresentação da doença.....	71
3.1.4 Relação das bandas oligoclonais IgG e IgM com a progressão da doença.....	74
3.1.4.a BOC IgG e IgM <i>versus</i> EDSS .....	74
3.1.4.b Bandas oligoclonais IgG e IgM face ao número de surtos no curso da EM.....	80
3.1.4.c Bandas oligoclonais IgG e IgM em função do subtipo clínico.....	82
3.1.4.d Bandas oligoclonais IgG e IgM <i>versus</i> terapêutica.....	84
<b>3.2 Marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica no líquido cefalorraquídeo e soro .....</b>	<b>85</b>
3.2.1 Caracterização da amostra .....	85
3.2.2 Determinação dos níveis de MMPs e TIMPs no LCR e soro .....	86

3.2.3 Determinação dos níveis de moléculas de adesão (sICAM-1, sVCAM-1, sE-seletina) no LCR e soro.....	90
3.2.4 Relação dos marcadores de disfunção da BHE com a progressão da EM .....	93
3.2.4.a Marcadores de disfunção da BHE <i>versus</i> EDSS.....	93
3.2.4.b Marcadores de disfunção da BHE em função do subtipo clínico .....	97
3.2.4.c Marcadores de disfunção da BHE <i>versus</i> terapêutica .....	101
3.2.5 Relação dos marcadores de disfunção da BHE com as bandas oligoclonais .....	102
<b>3.3 Polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 .....</b>	<b>106</b>
3.3.1 Caracterização da amostra .....	106
3.3.2 Distribuição do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9.....	106
3.3.2.a Polimorfismo -1562 C/T e curso da EM .....	108
3.3.3 Avaliação da concentração sérica de MMP-9 em função do genótipo e curso clínico da EM .....	111
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1 Considerações gerais .....</b>	<b>115</b>
<b>4.2 Bandas oligoclonais do tipo IgG.....</b>	<b>118</b>
4.2.1 Bandas oligoclonais IgG <i>versus</i> progressão da EM .....	121
<b>4.3 Bandas oligoclonais do tipo IgM.....</b>	<b>124</b>
4.3.1 Bandas oligoclonais IgM <i>versus</i> progressão da EM.....	125
<b>4.4 Marcadores de disfunção da BHE ó MMPs, TIMPs e CAMs.....</b>	<b>130</b>
4.4.1 Marcadores de disfunção da BHE <i>versus</i> progressão da EM.....	135
<b>4.5 Polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 e EM .....</b>	<b>138</b>
4.5.1 Relação entre o polimorfismo -1562 C/T, a concentração sérica de MMP-9 e características clínicas .....	141
<b>4.6 Limitações ao estudo .....</b>	<b>144</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>147</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>149</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> ó Atlas da esclerose múltipla, 2013.....	4
<b>Figura 1.2</b> ó Comparação entre um cérebro saudável e um cérebro com EM.....	14
<b>Figura 1.3</b> ó Representação esquemática das células e mecanismos que constituem a barreira hematoencefálica.....	16
<b>Figura 1.4</b> ó Inflamação periférica e cerebral em esclerose múltipla.....	30
<b>Figura 1.5</b> ó Mecanismos de lesão axonal propostos na EM.....	33
<b>Figura 1.6</b> ó Expanded Disability Status Scale (EDSS).....	37
<b>Figura 1.7</b> ó Imagens digitalizadas dos 5 tipos de bandas oligoclonais IgG, obtidas por focagem isoeletrica e imunoblotagem, nos pares de amostras soro e LCR. Laboratório de Neuroquímica do CHUC.....	39
<b>Figura 1.8</b> ó Representação esquemática dos mecanismos de ação de 4 fármacos usados no tratamento da esclerose múltipla.....	45
<b>Figura 2.1</b> ó Equipamento de focagem isoeletrica: tina para focagem, banho de arrefecimento termostaticado e fonte de alimentação.....	54
<b>Figura 2.2</b> ó Imunoglobulinas do tipo IgM (pentâmero) e IgG (monómero).....	56
<b>Figura 2.3</b> ó Imagem digitalizada de bandas oligoclonais IgM, obtidas por focagem isoeletrica e imunoblotagem, nos pares de amostras soro e LCR. Laboratório de Neuroquímica do CHUC.....	58
<b>Figura 2.4</b> ó Esquema geral do procedimento imunoenzimático em microplaca aplicado nos protocolos ELISA.....	59
<b>Figura 2.5</b> ó Exemplo de uma das curvas padrão efetuada num dos ensaios ELISA, sVCAM-1.....	62
<b>Figura 2.6</b> ó Eletroforese de fragmentos de ADN, após digestão com a enzima SphI.....	63
<b>Figura 3.1</b> ó Padrão de BOC IgG distribuído pelos grupos EM, DNI e DI.....	69
<b>Figura 3.2</b> ó Padrão de BOC IgM distribuído pelos grupos EM, DNI e DI.....	71
<b>Figura 3.3</b> ó Representação dos valores médios e erro padrão do EDSS atual em doentes de esclerose múltipla com BOC IgG positivas (n=152)/negativas (n=30) e BOC IgM positivas (n=19)/negativas (n=95).....	76
<b>Figura 3.4</b> ó Probabilidade de atingir um valor de EDSS $\times$ 4 em doentes de EM com BOC IgG positivas e negativas.....	78
<b>Figura 3.5</b> ó Probabilidade de atingir um valor de EDSS $\times$ 4 em doentes de EM com BOC IgM positivas e negativas.....	79

<b>Figura 3.6</b> ó Relação das BOC IgG positivas e negativas, face ao número de surtos no curso da doença. ....	81
<b>Figura 3.7</b> ó Relação das BOC IgM positivas e negativas, face ao número de surtos no curso da esclerose múltipla. ....	82
<b>Figura 3.8</b> ó Razão MMP/TIMP em LCR e soro nas amostras dos grupos EM, DNI e DI.....	89
<b>Figura 3.9</b> ó Razão LCR/soro de sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Selelina nas amostras dos grupos EM, DNI e DI. ....	91
<b>Figura 3.10</b> ó Razão MMP/TIMP em amostras de LCR e soro em doentes de EM versus incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM). ....	97
<b>Figura 3.11</b> ó Razão MMP/TIMP em amostras de LCR e soro em doentes de EM (EMSR versus progressivas). ....	100
<b>Figura 3.12</b> ó Probabilidade de atingir um valor de EDSS × 3 em doentes de EM portadores do polimorfismo -1562 C/T.....	110
<b>Figura 3.13</b> ó Representação gráfica da distribuição no subgrupo de 159 amostras (96 doentes de EM; 63 controlos saudáveis), segundo a concentração de MMP-9 e os genótipos (CC; CT+TT). ....	112
<b>Figura 3.14</b> ó Concentração sérica da MMP-9 determinada no subgrupo de doentes de EM relativamente às variáveis clínicas. ....	113

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> ó Terapias modificadoras da doença atualmente aprovadas pela EMA para tratamento da esclerose múltipla.....	46
<b>Tabela 2.1</b> ó Resumo dos protocolos dos marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica .....	61
<b>Tabela 3.1</b> ó Caracterização demográfica e clínica dos grupos EM, DNI e DI .....	68
<b>Tabela 3.2</b> ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG e IgM positivas por grupo.....	70
<b>Tabela 3.3</b> ó Características demográficas e clínicas iniciais dos doentes de EM com e sem BOC IgG .....	72
<b>Tabela 3.4</b> ó Características demográficas e clínicas iniciais dos doentes de EM com e sem BOC IgM.....	73
<b>Tabela 3.5</b> ó Variação do EDSS ao longo da doença em doentes com BOC IgG positivas e negativas.....	75
<b>Tabela 3.6</b> ó Variação do EDSS ao longo da doença em doentes com BOC IgM positivas e negativas.....	76
<b>Tabela 3.7</b> ó Distribuição das BOC IgG e IgM positivas, segundo o grau de incapacidade da EM .....	77
<b>Tabela 3.8</b> ó Distribuição das BOC IgG e IgM nos doentes que atingem ou não um EDSS igual ou superior a 4 aos 10 anos de doença .....	79
<b>Tabela 3.9</b> ó Distribuição das BOC IgG e IgM nos doentes que atingem ou não um.....	80
EDSS igual ou superior a 6 alguma vez durante o curso da doença .....	80
<b>Tabela 3.10</b> ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG e IgM positivas pelos subtipos clínicos .....	83
<b>Tabela 3.11</b> ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG em função da conversão de EMSR para EMSP .....	83
<b>Tabela 3.12</b> ó Distribuição das bandas oligoclonais IgM em função da conversão de EMSR para EMSP.....	84
<b>Tabela 3.13</b> ó Distribuição das BOC IgG e IgM com a terapêutica.....	85
<b>Tabela 3.14</b> ó Caracterização demográfica e clínica dos doentes de EM e controlos (DNI e DI) .....	87
<b>Tabela 3.15</b> ó Concentração de MMPs e TIMPs nas amostras de LCR e soro dos grupos EM, DNI e DI.....	88
<b>Tabela 3.16</b> ó Razão LCR/soro de MMPs e TIMPs nas amostras dos grupos EM, DNI e DI ...	88

<b>Tabela 3.17</b> ó Concentração das moléculas de adesão celular em amostras de LCR e soro nos grupos EM, DI e DNI.....	90
<b>Tabela 3.18</b> ó Correlação MMPs, TIMPs, sICAM-1, sVCAM-1, e sE-Selelina em amostras de LCR e soro nos doentes de EM .....	92
<b>Tabela 3.19</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM <i>versus</i> incapacidade.....	94
<b>Tabela 3.20</b> ó Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM <i>versus</i> incapacidade (EDSS <4; × 4).....	95
<b>Tabela 3.21</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM <i>versus</i> incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM).....	96
<b>Tabela 3.22</b> ó Razão LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM <i>versus</i> incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM) .....	98
<b>Tabela 3.23</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM (EMSR <i>versus</i> progressivas) .....	99
<b>Tabela 3.24</b> ó Razão LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM (EMSR <i>versus</i> progressivas).....	100
<b>Tabela 3.25</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM <i>versus</i> terapêutica.....	101
<b>Tabela 3.26</b> ó Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM <i>versus</i> terapia .....	102
<b>Tabela 3.27</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM e BOC IgG positivas e negativas .....	103
<b>Tabela 3.28</b> ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM e BOC IgM positivas e negativas.....	104
<b>Tabela 3.29</b> ó Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM <i>versus</i> BOC IgG e IgM positivas e negativas .....	105
<b>Tabela 3.30</b> ó Caracterização demográfica e clínica dos doentes de EM e controlos saudáveis .....	107
<b>Tabela 3.31</b> ó Distribuição do genótipo do polimorfismo -1562 C/T nos doentes e controlos	107
<b>Tabela 3.32</b> ó Distribuição do genótipo do polimorfismo -1562 C/T em doentes e controlos saudáveis, por sexo .....	108
<b>Tabela 3.33</b> ó Relação do polimorfismo -1562 C/T com os fatores clínicos, em doentes de EM .....	109
<b>Tabela 3.34</b> ó Variáveis testadas como preditivas do polimorfismo -1562 C/T.....	110
<b>Tabela 3.35</b> ó Caracterização demográfica, clínica e concentração sérica da MMP-9 nos doentes de EM e controlos saudáveis .....	111

## **Lista de abreviaturas**

- Ac(s)** ó Anticorpo(s)  
**ADN** ó Ácido desoxirribonucleico  
**ADEM** ó Encefalite aguda disseminada  
**Ag(s)** ó Antígeno(s)  
**APCs** ó *Antigen-presenting cells*  
**ARN** ó Ácido ribonucleico  
**ARNm** ó Ácido ribonucleico mensageiro  
**ATP** ó Adenosina trifosfato  
**BAFF** ó *B-cell activating factor*  
**BCSFB** ó *Blood cerebrospinal fluid barrier*  
**BCIP** ó 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato disódico  
**BHE** ó Barreira hematoencefálica  
**BOC** ó Bandas oligoclonais  
**Ca<sup>2+</sup>** ó Ião cálcio  
**CAMs** ó *Cellular Adhesion Molecules*  
**CDMS** ó *Clinically definite multiple sclerosis*  
**CHUC** ó Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra  
**CIS** ó *Clinically isolated syndrome*  
**CNPase** ó *2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*  
**CS** ó Controlos saudáveis  
**CV** ó Coeficiente de variação  
**DCs** ó *Dendritic cells*  
**DHODH** ó *Dihidro-orotate desidrogenase*  
**DI** ó Doenças inflamatórias  
**DIS** ó *Dissemination in space*  
**DIT** ó *Dissemination in time*  
**DMD** ó Dose mínima detetável  
**DMTs** ó *Disease-modifying therapies*  
**DNI** ó Doenças não inflamatórias

**dNTP** ó Desoxinucleótido trifosfato  
**D.O.** ó Densidade ótica  
**DP** ó Desvio padrão  
**EAE** ó Encefalomielite autoimune experimental  
**EBV** ó *Epstein-Barr virus*  
**EDSS** ó *Expanded Disability Status Scale*  
**ELISA** ó *Enzyme-linked immunosorbent assay*  
**EM** ó Esclerose múltipla  
**EMA** ó *European Medicines Agency*  
**EMP** ó Micropartículas endoteliais  
**EMPP** ó Esclerose múltipla primária progressiva  
**EMSP** ó Esclerose múltipla secundária progressiva  
**EMSR** ó Esclerose múltipla surto-remissão  
**(s)E-Selectin** ó *(soluble) E-Selectin*  
**ESTeSC** ó Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra  
**FDA** ó *Food and Drug Administration*  
**FIE** ó Focagem isoeletrica  
**GA** ó Acetato de glatirâmero  
**GWAS** ó *Genome-wide association studies*  
**Gd** ó *Gadolinium*  
**(s)ICAM-1** ó *(soluble) Intercellular adhesion molecule-1*  
**IFN** ó Interferão (beta)  
**IFN-gama** ó Interferão-gama  
**Ig** ó Imunoglobulinas  
**IgG** ó Imunoglobulinas do tipo G  
**IgM** ó Imunoglobulinas do tipo M  
**IL** ó Interleucina  
**ITS** ó *Intrathecal synthesis of immunoglobulins*  
**JCV** ó *John Cunningham virus*  
**K<sup>+</sup>** ó Ião potássio  
**K<sub>3</sub>EDTA** ó Ácido etilenodiaminotetracético tri-potássico  
**kDa** ó Kilodalton  
**LCR** ó Líquido cefalorraquídeo  
**LFA-1** ó *Lymphocyte function-associated antigen 1*

- LS-OCMB** ó *Lipid-specific oligoclonal IgM bands*
- m** ó Metro
- MAG** ó *Myelin-associated glycoprotein*
- MBP** ó *Myelin basic protein*
- MEC** ó Matriz extracelular
- MgCl<sub>2</sub>** ó Cloreto de magnésio
- MHC** ó *Major Histocompatibility Complex*
- MMP(s)** ó Metaloproteinase(s) da matriz
- MMP-2** ó Metaloproteinase da matriz-2
- MMP-9** ó Metaloproteinase da matriz-9
- MMP-MT** ó Metaloproteinases tipo membrana
- MOG** ó *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*
- Na<sup>+</sup>** ó Ião sódio
- NAB(s)** ó *Anti-IFN beta neutralizing antibodies*
- NBT** ó Nitro blue tetrazolium
- NF-KB** ó *Factor nuclear kappa B*
- NFL** ó Neurofilamentos
- NK** ó *Natural killer*
- NMO** ó Neuromielite ótica
- NO** ó Óxido nítrico
- NOSi** ó Sintase do óxido nítrico indutível
- Nrf 2** ó *Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*
- OCMB** ó *Oligoclonal IgM bands*
- OD** ó *Odds ratio*
- OMgp** ó *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein*
- PB** ó Placebo
- PCR** ó *Polimerase chain reaction*
- PECAM-1** ó *Platelet endothelial cell adhesion molecule-1*
- PL** ó Punção lombar
- PLP** ó Proteína proteolipídica
- PML** ó *Progressive multifocal leukoencephalopathy*
- PSGL1** ó *P-selectina glycoprotein ligand-1*
- PVDF** ó Difluoreto de polivinilideno
- RFLP** ó *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RM** ó Ressonância magnética  
**RMce** ó Ressonância magnética crânio encefálica  
**ROS** ó *Reactive oxygen species*  
**RNS** ó *Reactive nitrogen species*  
**SNC** ó Sistema nervoso central  
**SNP** ó *Single nucleotide polymorphism*  
**SPSS** ó *Statistical Package for Social Sciences*  
**TA** ó Temperatura ambiente  
**Taq** ó *Thermus aquaticus*  
**TAS** ó Taxa anualizada de surtos  
**Th** ó *T helper*  
**TIMP-1** ó Inibidor tecidual da metaloproteinase-9  
**TIMP-2** ó Inibidor tecidual da metaloproteinase-2  
**TIMPs** ó Inibidores tecidulares das metaloproteinases  
**TLRs** ó *Toll-like receptors*  
**TNF** ó *Tumor Necrosis Factor*  
**TRAIL** ó *TNF related apoptosis inducing ligand*  
**T reg** ó T reguladoras  
**TGF** ó *Transforming growth factor-beta*  
**(s)VCAM-1** ó *(soluble) Vascular cell adhesion molecule-1*  
**VLA-1** ó Antígeno de função tardia

# **1 Introdução**

## **1.1 Esclerose múltipla ó características gerais**

A Esclerose Múltipla (EM) é considerada uma doença multifactorial, inflamatória, desmielinizante crónica do sistema nervoso central (SNC). A EM é também caracterizada como uma desordem autoimune, envolvendo uma desregulação do sistema imune com consequente degradação da bainha de mielina, a substância branca. O processo desmielinizante conduz ao atraso ou bloqueio completo das vias de sinalização no SNC levando também a danos nos axónios e a um processo degenerativo. Na sequência de todos estes processos forma-se o tecido da cicatriz -"esclerose", em várias áreas no SNC -"múltipla" (Compston e Coles 2002; Kutzelnigg et al. 2005a; Hauser e Oksenberg 2006).

Como a maioria das doenças, a EM tem várias características de uma patologia complexa, incluindo etiologia, heterogeneidade, alterações temporais, herança poligénica, fatores de risco ambientais e predisposição genética. Patologicamente, a complexidade da doença envolve a localização, o tamanho, e a duração das lesões, que são variáveis e imprevisíveis. A ausência de previsibilidade pode conduzir a uma vasta gama de sintomas, que variam entre surtos ou episódios de maior gravidade da doença ao longo da progressão da mesma (Compston e Coles 2002; Kutzelnigg et al. 2005a).

### **1.1.1 Breve resenha histórica**

O caso mais antigo de esclerose múltipla remonta ao século XIV, uma madre de nome Lidwina (1380-1433), que residiu em Schiedam na Holanda e que, aos 16 anos, após uma queda quando patinava, desenvolveu uma doença aguda, manifestando queixas recorrentes sugestivas de EM como, alterações motoras e visuais que se agravaram com o tempo (Orrell 2005; Murray 2009).

Quatro séculos mais tarde, apareceu entre a nobreza uma descrição pessoal de Augustus d'Esté (1794-1848), neto ilegítimo do rei George III de Inglaterra, que descreveu no seu diário os vários sintomas iniciados em 1822 com cegueira monocular temporária e perda

de força. A doença agravou-se em consequência de numerosos surtos que conduziram à tetraparésia e morte (Firth 1941; Murray 2009).

Nos anos trinta do século XIX, surge a primeira exposição médica da EM, na forma de textos ilustrados por dois anátomo-patologistas, Robert Carswell (1793-1857) da Escócia e Robert Hooper (1773-1835) britânico. Em França, Jean Cruveilhier (1791-1873) designou a EM por *ödgenerescência cinzentaö*, que descreveu e ilustrou com excelentes desenhos de alterações histopatológicas desencadeadas pela doença e publicados em dois volumes (Murray 2009).

Em 1849 na Polónia, Friedrich Theodor Frerichs, professor de patologia e terapêutica, expôs as manifestações clínicas da doença, pela primeira vez em alemão. Mais tarde o seu discípulo Wilhelm Valentiner, em 1856 relatou dois casos clínicos salientando a evolução da doença por surto-remissão, alterações cognitivas, queixas visuais entre outras, bem como, a presença de numerosas placas cinzento-avermelhadas de *öescleroseö* no cérebro e tronco cerebral dos doentes e, por vezes, localizadas na substância cinzenta (Murray 2009; Almeida 2010). Em 1866, Edmé Vulpian mostrou um artigo que caracterizava a doença com a presença de uma ou várias placas acinzentadas no cérebro e na espinal medula (Murray 2009).

Jean-Martin Charcot (1825-1893), notável médico francês, foi o primeiro professor de doenças do sistema nervoso e um dos principais investigadores do séc. XIX no campo da neurologia clínica, sendo considerado o pai da neurologia moderna. Charcot iniciou o seu trabalho de investigação em doenças neurológicas no *Hospital de la Salpêtrière*, fundou um laboratório de patologia que incluía microscopia e fotografia (Orrell 2005; Gomes e Engelhardt 2013). Este foi fundamental para a implementação de aulas com base num modelo de anatomia patológica relacionado com as manifestações clínicas, reveladas pelo doente no âmbito da neurologia (Gomes e Engelhardt 2013). Em 1868 publicou os seus casos clínicos, bem como, a compilação de todas as observações dos seus antecessores. Descreveu uma tríade, que considerava como diagnóstica da EM, consistindo numa associação de nistagmo, voz escandida e tremor de intenção, que ficou conhecida por tríade de Charcot (Orrell 2005; Murray 2009; Almeida 2010). Mencionou já, nos doentes, alterações cognitivas e agitação ocasional. Fez uma descrição neuropatológica e explicou a desmielinização e astrocitose, processos já divulgados por Frommann, em 1864. Após exposição dos casos num centro neurológico com a credibilidade de Salpêtrière por Vulpian e Charcot a doença designada por *la sclerose en plaques disseminées, sclerose*

*generalisée* ou *sclerose multiloculaire*, passou a ser considerada uma entidade nosológica (Orrell 2005; Almeida 2010). Charcot foi o primeiro a correlacionar as características clínicas da EM com as alterações patológicas encontradas *post-mortem* (Gomes e Engelhardt 2013). Contudo, apenas nos anos cinquenta do séc. XX e na Alemanha, passou a ser consensual a designação de *Esclerose Múltipla*, para esta patologia (Murray 2009; Almeida 2010).

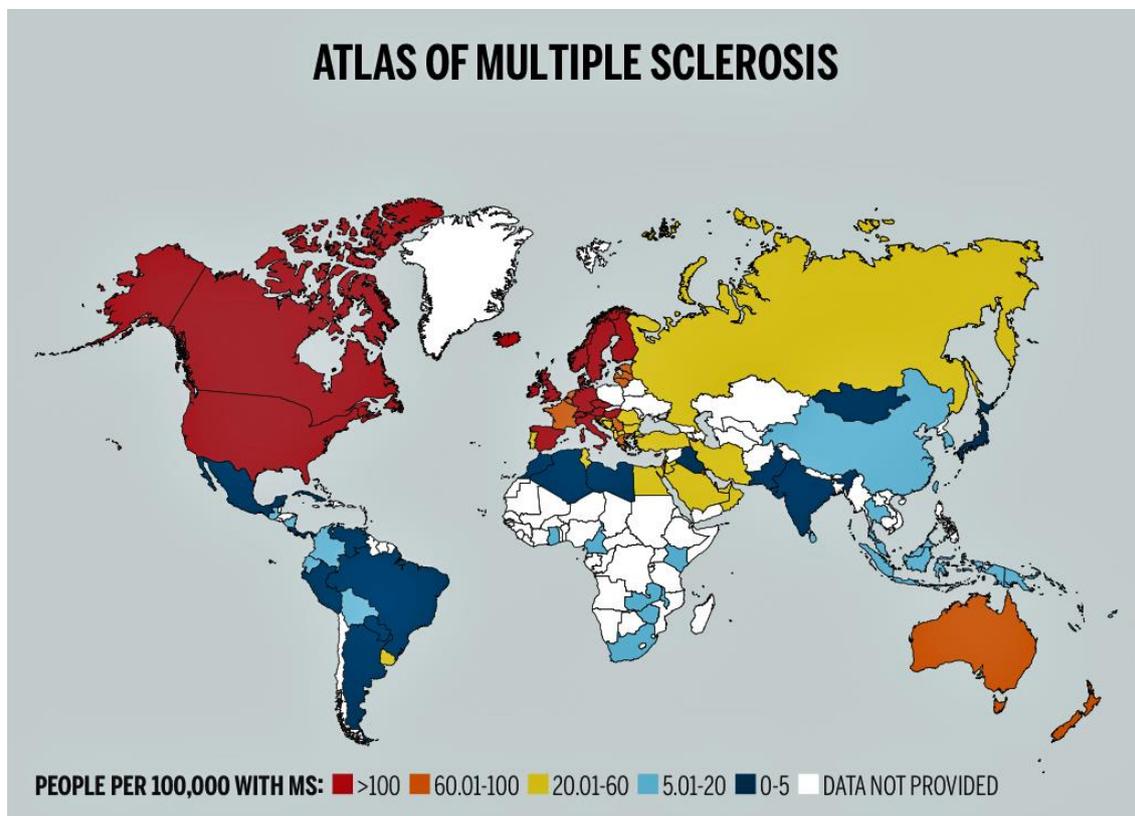
Em 1965, Schumacher e colaboradores desenvolveram os primeiros critérios oficiais para o diagnóstico da EM: o início dos sintomas entre 10 e 50 anos de idade, exame neurológico com anormalidades objetivas, sinais e sintomas indicando danos na substância branca do SNC, duas ou mais lesões separadas, dois ataques com pelo menos um mês de intervalo (Schumacher et al. 1965).

### **1.1.2 Epidemiologia**

A EM é uma das patologias neurológicas mais estudadas no campo da epidemiologia. Após a divulgação do artigo de Sydney Allison em 1931 (Allison 1931), muitos estudos têm sido realizados sobre a distribuição e frequência da EM no mundo. No entanto, apesar do esforço das investigações, muitas incertezas permanecem sobre a distribuição geográfica, incidência e prevalência da doença.

A esclerose múltipla não se encontra igualmente distribuída no globo (Figura 1.1), estimando-se que, no total da população mundial, existam entre 2-2,5 milhões de indivíduos afetados. A EM é considerada uma doença dos climas temperados, com uma prevalência superior a 100-200 casos/100.000 habitantes, sendo moderadamente comum na Europa, nos Estados Unidos, Canadá, Rússia, Israel, Nova Zelândia e partes da Austrália. É rara na Ásia e em regiões tropicais e subtropicais, com uma prevalência inferior a 5 casos/100.000 habitantes. Nas regiões de clima temperado, a incidência e prevalência aumenta com a latitude, para norte e para sul do equador (Kurtzke 1995). Nas áreas de alto risco, a incidência oscila de 0,1 a 0,2%. Indivíduos de regiões acima de 40° de latitude no hemisfério ocidental, geralmente, têm maior risco de desenvolver a doença, comparativamente a outras regiões. Embora as regiões de risco não mudem, parece que o gradiente de latitude se está a diluir, apontando para um aumento da incidência nas regiões do sul; por exemplo, a parte sul dos Estados Unidos tem uma incidência comparável ao norte e as regiões do sul da Europa têm maior incidência (Ascherio e Munger 2007a).

Países equatoriais são vulgarmente as áreas de baixo risco, enquanto os países mais a norte e mais a sul tendem a ser áreas de alto risco (Kantarci e Wingerchuk 2006).



**Figura 1.1** ó Atlas da esclerose múltipla, 2013. O Atlas da esclerose múltipla é o estudo mundial mais extenso da doença. Prevalência por 100.000 habitantes. Segundo *MS International Federation*. Disponível online em: <https://www.msif.org/about-us/who-we-are-and-what-we-do/advocacy/atlas/>

Existem, no entanto, bolsas de alta frequência da EM como a Sardenha, na região quente do sul do Mediterrâneo (Granieri et al. 2000), enquanto entre as pessoas do Inuit que vivem no norte frio do Canadá, a frequência de EM é baixa (Chan 1977), ao contrário do que seria de prever a partir de um simples modelo geográfico, temperatura ambiente/latitude no plano de distribuição geográfica da EM (Milo e Kahana 2010).

Nos países do sul da Europa e do mediterrâneo, a prevalência da EM tem sido amplamente subestimada (De Sa et al. 2006). Nos últimos anos, vários estudos em diferentes países, como a Grécia (Milonas et al. 1990), Espanha (Benito-Leon et al. 1998; Pina et al. 1998; Tola et al. 1999), Chipre (Middleton e Dean 1991) continente italiano (Casetta et al. 1994; Granieri et al. 1996; Solaro et al. 2005), Sardenha (Rosati et al. 1996; Pugliatti et al. 2001)

e Sicília (Salemi et al. 2000; Nicoletti et al. 2001; Ragonese et al. 2004) apresentaram valores de prevalência de EM superiores ao previsto (De Sa et al. 2006). De facto, a Europa não segue o padrão rigoroso de variação com latitude como postulado por Kurtzke nos anos oitenta (Casetta et al. 1994; Benito-Leon et al. 1998). Nos países europeus, a regra de variabilidade da prevalência é com *clusters* de alta ou baixa prevalência da EM apesar da latitude (De Sa et al. 2006).

Em Portugal a tradição de registos epidemiológicos é baixa e a verdadeira prevalência da EM é desconhecida. Tendo em conta estudos efetuados em países do sul da Europa, De Sá e colaboradores em 2006, investigaram sobre a prevalência da esclerose múltipla no distrito de Santarém (De Sa et al. 2006). Este estudo populacional, realizado em novembro de 1998, foi o primeiro a revelar a prevalência da esclerose múltipla no distrito de Santarém em 46,3/100.000 habitantes, sendo nas mulheres 67,6/100.000 habitantes e nos homens 23,3/100.000 habitantes, com a razão mulher/homem de 2,9.

Mais tarde, De Sá e colaboradores em 2012, continuaram os estudos de prevalência da EM, a norte do distrito de Lisboa, nas localidades de Odivelas, Benfica e Pontinha, registando valores de 53,0, 62,4 e 57,5/100.000 habitantes, respetivamente. Na população total do estudo, o valor encontrado foi de 58,0/100.000 habitantes (De Sa et al. 2012).

Em 2014, foram publicados estudos de incidência da EM numa população a norte de Lisboa realizados no período de 1998 a 2007. A incidência foi de 4,48/100.000 habitantes/ano. No geral, as taxas de incidência foram três vezes mais elevadas no sexo feminino, comparativamente ao masculino. O pico de incidência manifestou-se na faixa etária 35-44 anos. A incidência revelou-se similar ou moderadamente inferior à registada em populações europeias (De Sa et al. 2014).

A EM é a causa mais comum de incapacidade neurológica em adultos jovens com idade de início normalmente entre 20 e 40 anos (Zuvich et al. 2009; Iwanowski e Losy 2015). A incidência é baixa na infância, aumentando rapidamente na idade adulta, manifestando um pico entre os 25 e 35 anos, que habitualmente nas mulheres ocorre cerca de 2 anos antes, em comparação com os homens. Após os 35 anos a incidência diminui lentamente, tornando-se rara a partir dos 50 anos (Ascherio e Munger 2007a; Ebers 2008; Ebers e Daumer 2008). As mulheres apresentam maior risco para a EM do que os homens. Na maioria das populações a relação entre mulheres e homens varia entre 1,5 e 2,5 (Orton et al. 2006), revelando-se uma tendência para maiores valores em estudos mais recentes

(Zuvich et al. 2009). Em populações de alto risco, o risco da EM é cerca de 1 em 200 para as mulheres e um pouco menos para os homens (Ascherio e Munger 2007a). Isto é consistente com o fenómeno de que as mulheres, particularmente durante a idade fértil, são mais propensas a desenvolver doenças autoimunes.

A diversidade na distribuição da EM poderá ser relevante no estudo etiológico da doença (Compston 1994), bem como fatores ambientais e genéticos estarão envolvidos na etiopatogenia da mesma (Noseworthy et al. 2000).

### **1.1.3 Etiologia/Fatores de risco**

A verdadeira causa da EM é ainda desconhecida. Fatores genéticos, infecciosos, ambientais e imunológicos estão implicados na etiologia desta complexa, multifactorial e heterogénea doença. Digamos que será impossível abranger todos os aspetos da geoepidemiologia e fatores ambientais associados com a esclerose múltipla (Milo e Kahana 2010; Iwanowski e Losy 2015).

#### **1.1.3.a Exposição solar/Vitamina D**

A variação geográfica da EM parece apontar para que diferenças geográficas relativas à quantidade de exposição solar possam ser potenciais fatores de risco da doença.

Alguns trabalhos tentaram avaliar o efeito da exposição à radiação solar na incidência da EM (Freedman et al. 2000; Goldacre et al. 2004; Islam et al. 2006). Foi realizado um estudo caso-controle onde os participantes foram convidados a recordar o tempo de exposição solar em idades específicas, indicando se estavam em espaços interiores ou exteriores, para de forma indireta perceber a influência na doença. Mostrou-se que uma maior exposição solar (média 2-3 h ou mais/dia durante fins de semana e feriados), nas idades entre 6-10 anos estava associada com uma diminuição do risco de esclerose múltipla (Van der Mei et al. 2003).

A exposição solar é uma fonte essencial na formação de vitamina D. Os raios UV convertem o 7-desidrocolesterol cutâneo em pré-vitamina D<sub>3</sub>, que espontaneamente isomeriza em vitamina D<sub>3</sub>. Esta sofre de seguida uma série de hidroxilações, primeiro para 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), forma circulante e, seguidamente para 1,25-dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), forma biologicamente ativa (Ascherio e Munger

2007b; Milo e Kahana 2010). Os níveis sanguíneos de vitamina D são geralmente menores nos europeus do norte (especialmente nos meses de inverno) em comparação com os habitantes de latitudes mais baixas. Contudo, os padrões de incidência da EM têm mostrado que, provavelmente, o risco não está apenas associado com a produção endógena de vitamina D decorrente da exposição solar. Por exemplo, a região do extremo norte da Noruega deveria ter a maior incidência de EM, mas a Escócia e a Inglaterra têm taxas de incidência mais elevadas. Isto sugere a existência de outro tipo de interação entre a luz solar e outros fatores, como por exemplo a dieta (Ebers 2008).

A vitamina D é também fornecida pelos alimentos. A influência da ingestão da vitamina D no risco de EM foi avaliada num estudo prospectivo realizado em dois grupos de mulheres: *Nurses Health Study* (NHS: 92253 seguidas entre 1980-2000) e *Nurses Health Study II* (NHS II: 95310 seguidas entre 1991-2001). A ingestão de vitamina D foi avaliada regularmente, no início do estudo e atualizada a cada 4 anos, através de um questionário. No seguimento foram confirmados 173 casos de EM. A ingestão de vitamina D foi inversamente associada ao risco de EM. No entanto, nenhuma associação foi encontrada entre frequência de EM e ingestão de vitamina D a partir de alimentos na dieta (Munger et al. 2004). Apesar da vitamina D ser considerada, de entre os componentes alimentares, a mais plausível a ter em conta na proteção contra a EM, outros fatores alimentares associados ao estilo de vida como o uso de suplementos alimentares podem estar envolvidos.

Um estudo de correlação entre os níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> sanguíneos e o risco de EM, realizado entre 1992 e 2004 em amostras de soro de 514 militares norte-americanos, mostrou que o risco de EM era menor entre os indivíduos com níveis de 25(OH)D<sub>3</sub> × 100 nmol/L, comparativamente aos com valores inferiores a 75 nmol/L (Rubertone e Brundage 2002; Levin et al. 2005).

Um ensaio clínico com suplementação diária de cálcio, magnésio e vitamina D, durante um a dois anos mostrou uma diminuição da taxa de agravamento da EM. O mecanismo postulado dos benefícios da vitamina D envolve a regulação do sistema imunitário, com inibição da produção de citocinas inflamatórias por macrófagos ativados, o aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias e a redução do ARNm de interleucina 2 (IL-2) no sangue periférico, melhorando a auto-tolerância imunológica. Em modelos animais de EM, verificou-se que injeções de 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> suprimem a encefalomielite autoimune experimental (EAE) e previnem os sinais clínicos e patológicos da doença. Além dos

níveis sanguíneos, polimorfismos genéticos no recetor da vitamina D também têm sido associados a deficiência no metabolismo da vitamina D e a suscetibilidade para esclerose múltipla (Smolders et al. 2009a; Smolders et al. 2009b).

Pensando na interação fatores genéticos, exposição solar e vitamina D, foi investigada a possível relação da data de nascimento com a EM, em vários países. Foi avaliada a sazonalidade no mês de nascimento em 6276 doentes dinamarqueses e foi encontrado um aumento entre os meses de abril e junho. Na Suécia, num universo de 6393 doentes encontrou-se um acréscimo entre os meses de maio e julho. Tendência semelhante foi registada em 965 doentes na Sicília (Willer et al. 2005). No Canadá, 17874 doentes e 11502 na Grã-Bretanha mostraram um aumento no mês de maio. Todos os estudos foram realizados em países do norte e apresentaram um acréscimo de nascimentos de doentes de EM na primavera. A interpretação geral foi as mães terem baixos níveis de vitamina D durante a gravidez, que ocorreu no inverno (Milo e Kahana 2010).

### **1.1.3.b Hipótese vírica/hipótese de prevalência/hipótese higiénica**

Outros fatores de risco envolvem um patogénico comum específico para determinadas áreas geográficas, diferenças sazonais e variedade de minerais do solo. Relativamente a um micróbio que possa estar na origem da EM generalizada, existem duas hipóteses principais: a hipótese vírica e a hipótese de prevalência.

A hipótese vírica sugere que um vírus aumenta o risco de desenvolvimento da EM, se a pessoa é infetada no final da infância/início da idade adulta. No entanto, se a pessoa é infetada durante a infância o vírus confere proteção.

Na hipótese de prevalência basta declarar que um agente patogénico específico, não identificado, causa a EM e é mais comum em regiões de alto risco. De acordo com ambas as hipóteses, a idade de infeção por estes microrganismos determina o seu nível de suscetibilidade à doença (Ascherio e Munger 2007a). Ainda, na hipótese de prevalência, Kurtzke defende a teoria baseada na epidemia das ilhas Faroe (Kurtzke 2005).

Para Fleming JO e Cook TD a chamada hipótese higiénica tenta explicar o incremento aparente de doenças autoimunes na generalidade, e também na esclerose múltipla. Tem como apoio a ideia de que o desenvolvimento do sistema imune em idade precoce necessita de uma estimulação. Nos países desenvolvidos, a vacinação sistémica, a utilização generalizada de antibióticos, e melhores cuidados sanitários reduzem a

frequência e variedade de infecções na infância. Em consequência, não haveria uma evolução adequada do sistema autoimune e, mais tarde na vida adulta, quando sujeito a um estímulo tenderia a desenvolver autoimunidade (Fleming e Cook 2006). Deste modo, a hipótese higiênica poderia justificar muitos dos achados epidemiológicos como o gradiente de latitude, a aparente proteção para a EM dos indivíduos nascidos em zonas de reduzido risco que migram para zonas de maior risco e elevada incidência de EM em indivíduos com maior nível económico e de educação (Russell 1971).

Contudo, uma limitação à hipótese higiênica é a multiplicidade de agentes infecciosos e a resposta imune por eles desenvolvida no hospedeiro, parecendo improvável que todos os micróbios ou parasitas estejam igualmente envolvidos na predisposição para a esclerose múltipla. De facto observações em modelos animais de doenças autoimunes sugerem melhoria de algumas infecções, enquanto outras contribuem para evitar doenças autoimunes (Bach 2002).

Uma segunda limitação, designada como paradoxo do vírus Epstein-Barr (EBV), é o risco extremamente baixo para EM entre indivíduos seronegativos para EBV, que não contraíram a infeção na infância e experienciaram uma educação mais higiênica que os EBV-positivos. Este conceito suporta uma correlação positiva entre idade da infeção e *status* socioeconómico (Warner e Carp 1981). Assim, segundo a hipótese higiênica, esses indivíduos deviam ter um alto risco para EM. Em contraste, o risco para EM é muito inferior ao dos seus pares EBV-positivos (Haahr et al. 2004; Ponsonby et al. 2005).

O facto da associação da infeção pelo EBV com o aumento do risco de EM ter permanecido oculta durante muitos anos, resulta, provavelmente, do facto do EBV infetar mais de 95% da população adulta. Parece, portanto um paradoxo como é que um vírus que infeta quase toda a população pode causar uma doença rara como a EM. Além disso, o risco para EM encontra-se significativamente aumentado entre os indivíduos com uma história de mononucleose infecciosa, manifestação comum da infeção EBV na adolescência ou idade adulta (Cohen 2000), em comparação com indivíduos sem infeção (Thacker et al. 2006), sugerindo que a infeção com EBV na idade pré-adulta aumenta mais as hipóteses de desenvolvimento da doença. Usando como referência indivíduos infetados com EBV na primeira infância, o risco de EM é cerca de 10 vezes menor entre os indivíduos EBV-negativos, e cerca de 2 a 3 vezes maior entre os infetados com EBV em idade adulta (como inferido a partir do histórico de mononucleose); assim, existe no mínimo, um risco 20 vezes maior entre indivíduos com história de mononucleose

comparativamente com aqueles que são EBV-negativos (Ascherio e Munger 2007a). Porém a infecção pelo EBV constitui um paradoxo se o contacto ou infecção com o agente é durante a infância confere proteção contra EM, mas se o contacto é no início da idade adulta, desencadeia a doença (Ascherio e Munger 2007a; Milo e Kahana 2010).

Muitas, mas não todas, as particularidades epidemiológicas da EM parecem consistentes com a infecção por EBV: ambas as doenças seguem um gradiente de latitude similar; em áreas onde a EM é rara, a proporção de indivíduos jovens seropositivos para EBV é maior, enquanto nas áreas em que EM é mais comum, a proporção de seropositividade para EBV não atinge níveis elevados após a adolescência. Na idade adulta, mais de 90% da população em geral é EBV seropositiva. Isto implica que a infecção precoce com EBV pode ser protetora contra a EM e também explica a alta frequência de EM em populações de elevado *status* socioeconómico e baixa frequência em negros e asiáticos. Na Austrália, acredita-se que o EBV é o agente com maior representatividade de norte a sul, aumentando a EM no hemisfério sul em associação com o gradiente de latitude (Milo e Kahana 2010).

O EBV tem especificidades que tornam o seu papel plausível na EM. A exposição ao vírus resulta em infecção persistente de células B, que ativam e proliferam. As células B infetadas que proliferam são geralmente eliminadas por células T CD8+ citotóxicas específicas de EBV, mas persistem células B memória com infecção latente não proliferativas. Uma sequência pentapeptídica do antígeno nuclear EBV é homóloga a um epítipo de proteína básica de mielina. O EBV também induz a expressão de alfa-B cristalina à superfície das células B, um autoantígeno constituinte importante, que é expresso de forma anormal no cérebro de doentes de EM. Isto, teoricamente pode explicar como o EBV pode estimular a geração de células T auto-reactivas específicas de mielina em EM. Além disso, a vitamina D pode modificar a resposta imune ao EBV em fases fundamentais do desenvolvimento, mas isso ainda precisa ser comprovado (Milo e Kahana 2010).

Diversos outros vírus também têm sido indicados como potenciais agentes causadores da EM, embora os dados seroepidemiológicos não sustentem uma forte associação com alguns destes, como o vírus do sarampo (Shirodaria et al. 1987; Sundstrom et al. 2004), vírus herpes simplex 1 (Ferrante et al. 1987; Wandinger et al. 2000), vírus varicela zoster (Sundstrom et al. 2004) ou rubéola (Leinikki et al. 1982; Shirodaria et al. 1987).

Há ainda registros que outros agentes infecciosos parecem estimular o aparecimento da EM, como o *Acinetobacter species* e *Pseudomonas aeruginosa* (Hughes et al. 2003), a *Chlamydia pneumoniae* (Marrie 2004) ou helmintas e infecções micobacterianas (Sewell et al. 2002).

### **1.1.3.c Genética**

Estudos familiares e estudos individuais têm mostrado que existe uma forte componente genética subjacente à etiologia da doença. A prevalência desta doença em parentes de primeiro grau de indivíduos afetados é 20 a 40 vezes maior que a prevalência da população global (Mumford et al. 1994; Sadovnick e Ebers 1995). A maior taxa de concordância encontra-se nos gêmeos monozigóticos (25-34%) comparativamente à dos gêmeos dizigóticos (2-5%) indicando uma elevada hereditariedade. Vários estudos genéticos têm avaliado o risco da doença entre os membros da família de um indivíduo afetado. Assim, os indivíduos geneticamente idênticos (gêmeos monozigóticos) apresentam maior risco, enquanto os geneticamente independentes ou seja, população em geral manifestam menor risco (0,1-0,2%), mesmo em áreas geográficas de alta prevalência. Em casos de adoção o risco é comparável ao da população em geral indicando que a partilha de vida com um indivíduo afetado tem pouco ou nenhum efeito sobre a suscetibilidade de desenvolver a doença na ausência de afinidade biológica (Compston e Coles 2002; Kantarci e Wingerchuk 2006). Estes estudos parecem desmentir a ideia do efeito da ascendência materna, além da já bem conhecida preponderância do sexo feminino na esclerose múltipla (Ebers et al. 2004).

Apesar da predisposição genética provavelmente contribuir para as alterações geográficas na distribuição da EM (Ebers e Sadovnick 1993), esta não explica as diferenças de risco observadas entre populações que migram de zonas de elevada prevalência, para zonas de baixa prevalência da doença, e vice-versa. Em geral, estudos em populações geograficamente estáveis evidenciam diferenças na suscetibilidade genética, enquanto estudos com migrantes procuram demonstrar a importância de fatores exógenos adquiridos. Por exemplo, na África do Sul, a prevalência da EM é relativamente alta entre imigrantes europeus e baixa entre os africanos. Aparentemente os que imigraram do norte da Europa na idade adulta transportaram a prevalência elevada do seu país de origem, enquanto os que imigraram antes dos 15 anos passaram a evidenciar uma prevalência

similar à da população local africana (Dean 1967). De facto, poucos estudos exploraram a idade da imigração e os investigadores Gale e Martyn sugeriram que o risco de EM é amplamente estabelecido durante as duas primeiras décadas de vida (Gale e Martyn 1995). Assim a prevalência da EM não depende apenas da etnia da população, mas também da idade de imigração, envolvendo a ação de fatores ambientais antes da adolescência (Gale e Martyn 1995).

Como apoio à etiologia genética observa-se alguma diversidade nas etnias. Na Escandinávia e Escócia, a etnia caucasiana é extremamente suscetível à doença (Bulman 1992). No entanto a EM é rara na Mongólia, nas etnias japonesas, chinesas, índios americanos (Rosati 2001), e esquimós (Chan 1977). Também é menos frequente em negros africanos, aborígenes, e ciganos (Milo e Kahana 2010). A irregular disposição geográfica e as diferenças étnicas na frequência da EM têm sido alvo de interesse para a comunidade científica há quase um século. Contudo, a frequência por gradiente de latitude geral persiste (Kurtzke 2005).

Devido à sua natureza autoimune, as primeiras tentativas para identificar genes da EM foram orientadas para o complexo major de histocompatibilidade (MHC). A associação entre MHC e EM foi descoberta pela primeira vez no início de 1970 (Bertrams e Kuwert 1972; Batchelor et al. 1978). O haplótipo específico associado com a combinação alélica HLA-DR2 (DRB1 HLA-DRB1 \* 1501-DQB \* 0602) (Kantarci e Wingerchuk 2006) é responsável por esta associação, mas só explica cerca de 25-35% do componente genético da EM (Haines et al. 1998; Dymment et al. 2004; Sawcer 2008), com um *odds ratio* de aproximadamente 2,00. Mais recentemente, os efeitos independentes adicionais de alelos no locus de HLA-DRB1 (Barcellos et al. 2006) e outros loci dentro do MHC foram descritos (Yeo et al. 2007; Chao et al. 2008). No entanto, o mecanismo exato de como esta região aumenta a suscetibilidade ainda é desconhecido. Novas abordagens genéticas, como a associação de estudos do genoma, com os dados do projeto genoma humano, permitiram identificar novas suscetibilidades dentro e fora da região HLA (Milo e Kahana 2010).

Estudos recentes de *Genome-wide association studies* (GWAS) constituem uma alternativa às análises clássicas e, com maior poder estatístico para detetar variantes que conferem um modesto risco de doença (Yang et al. 2005). Em 2011, um GWAS colaborativo internacional com mais de 9.000 casos de EM replicou muitas das associações anteriormente sugeridas, identificando mais 29 novos loci de suscetibilidade

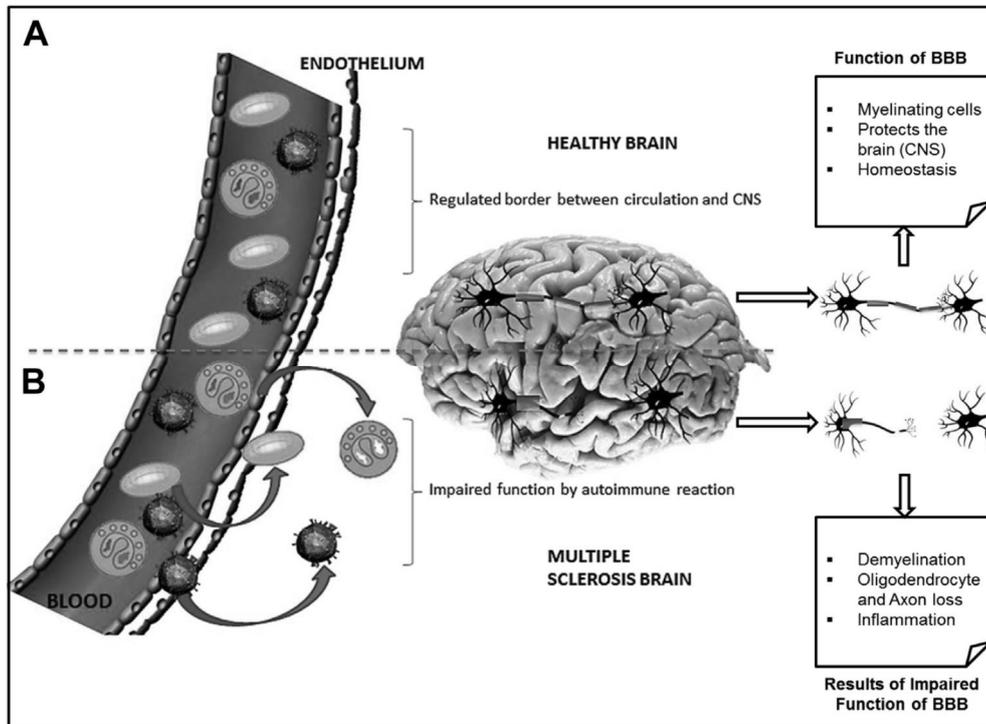
ó cerca de metade do risco genético para a EM (Hafler et al. 2007). Estes SNPs podem ser analisados respeitando a função provável ou conhecida de genes próximos. Existe um enriquecimento significativo de genes ligados à função de linfócitos, particularmente genes com um papel na ativação e proliferação de células T, vias de citocinas, moléculas co-estimuladoras e transdução de sinal. A extensa informação genética obtida a partir de GWAS nos últimos anos, em combinação com novos métodos de via e análise de rede de variantes de risco, abriu a porta para explicar os defeitos na regulação imune a partir de diferenças alélicas (Sawcer et al. 2011; Nylander e Hafler 2012).

## **1.2 Fisiopatologia da esclerose múltipla**

Para explicar a fisiopatologia da EM aceita-se como modelo-padrão uma doença imuno-mediada com resposta autoimune contra vários antigénios, proteicos e lipídicos, da mielina do SNC (Steinman 1996; Hemmer et al. 2002). Conforme descrito na secção anterior, a EM deverá surgir em indivíduos geneticamente suscetíveis após convivência com um fator ambiental ainda desconhecido. Este contacto desencadeia uma resposta imune desordenada, afetando alvos antigénicos presentes na mielina do SNC. A resposta torna-se autónoma face aos normais mecanismos de regulação e origina uma doença desmielinizante crónica. A desmielinização e eliminação dos axónios estão associadas a múltiplas reações como, a formação de citocinas inflamatórias com capacidade destruidora, excitotoxicidade por níveis elevados de glutamato, radicais livres de oxigénio e óxido nítrico, citotoxicidade dependente de anticorpos e indução de apoptose por contacto direto de linfócitos T citotóxicos (Sospedra e Martin 2005).

Assim, o processo patológico subjacente à EM é caracterizado por inflamação, desmielinização, perda axonal e atrofia cerebral. A placa desmielinizante é a lesão típica da EM, com origem na falta de mielina, transeção axonal e presença de cicatrizes gliais, envolvidas por um infiltrado inflamatório formado por linfócitos, macrófagos, anticorpos, fatores de complemento, e mediadores moleculares da resposta imune. (Hafler 2004; Hafler et al. 2005; Frohman et al. 2006). À medida que a doença progride observa-se um aumento das lesões axonais difusas, com atrofia do SNC, (ver Figura 1.2), associada a uma reação inflamatória crónica, de baixa intensidade, na substância branca e na substância cinzenta, permitindo caracterizar duas fases distintas na fisiopatologia da EM: fase inicial inflamatória, e fase tardia degenerativa (Steinman 2001). No entanto, os

primeiros sinais de degeneração aparecem na fase inflamatória, e a atividade do sistema imune permanece afetada na fase degenerativa.



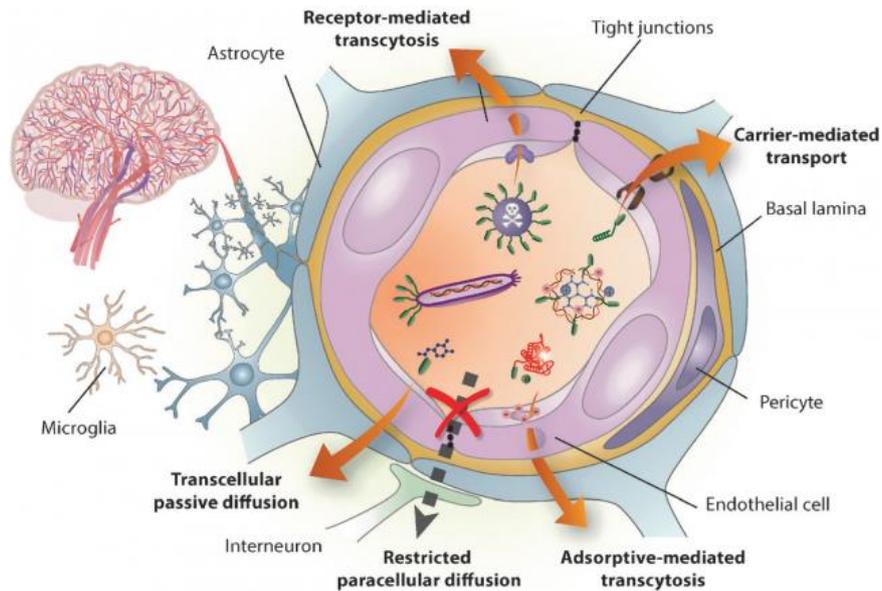
**Figura 1.2** ó Comparação entre um cérebro saudável e um cérebro com EM. (A) A barreira hematoencefálica é uma estrutura endotelial extremamente específica que funciona como proteção cerebral, mantendo funcional a homeostase e a mielinização. (B) Em condições patológicas, a disfunção da barreira hematoencefálica permite a infiltração de células imunitárias, seguida de resposta inflamatória. No cérebro as lesões de doentes de EM envolvem processos de desmielinização, perda axonal e doença neurodegenerativa. Figura gentilmente cedida por (Ortiz et al. 2014).

A fase crónica e neurodegenerativa é especializada na acumulação de lesões cicatríciais, atrofia do SNC, e incapacidade neurológica progressiva. A capacidade regenerativa dos axónios no SNC encontra-se gravemente comprometida pela presença de vários inibidores do crescimento axonal presentes na mielina (Filbin 2003). A acumulação de cicatrizes gliais com perda axonal difusa e inflamação subclínica origina uma atrofia progressiva do SNC, associada à fase de progressão de incapacidade neurológica e de disfunção cognitiva (Frohman et al. 2005; Frohman et al. 2006; Imitola e Khoury 2006).

### **1.2.1 Barreira hematoencefálica**

O microambiente do SNC é fundamental para a função neuronal. As barreiras sangue-cérebro são essenciais na manutenção da homeostase do SNC, protegendo o cérebro da exposição às constantes oscilações da concentração dos constituintes sanguíneos e ainda, no transporte de nutrientes e produtos do metabolismo cerebral para dentro e fora do cérebro, respetivamente (Ortiz et al. 2014). Duas barreiras principais separam o SNC da periferia: a barreira hematoencefálica (BHE), e a *blood cerebrospinal fluid barrier* (BCSFB). A BHE apresenta maior superfície que a BCSFB, logo considera-se mais relevante no mecanismo de transporte cerebral e a sua funcionalidade pode alterar o transporte transcelular e paracelular, quando ocorrem modificações nos processos fisiopatológicos (Salama et al. 2006; Ransohoff e Engelhardt 2012). Estas barreiras representam uma complexa rede vascular constituindo uma barreira celular contínua entre o SNC e a circulação sistémica, onde a maioria das trocas metabólicas, bem reguladas, ocorre através da complexa rede vascular.

A BHE é uma estrutura endotelial complexa, formada por vários tipos celulares e componentes da matriz extracelular (MEC). Assim, a BHE é constituída por células endoteliais, pericitos, microglia perivascular e astrócitos em associação com a lâmina basal (ver Figura 1.3). A MEC altamente organizada localiza-se na interface entre os vasos sanguíneos e a glia, o que facilita a interação das proteínas da MEC com os recetores endoteliais, desempenhando um papel fundamental nas vias de sinalização intercelular, migração e durante a angiogénese. As propriedades restritivas da BHE são preservadas através do complexo sistema celular de junções de oclusão e de adesão, principais reguladores da permeabilidade celular, entre as células epiteliais. A funcionalidade da BHE depende de interações complexas entre as suas células endoteliais, astrócitos perivasculares, e pericitos. A sua permeabilidade seletiva desempenha um papel essencial na homeostase metabólica e imuno-reguladora do SNC (Risau e Wolburg 1990; Banks 1999; Spuch 2010; Upadhyay 2014).



**Figura 1.3** é Representação esquemática das células e mecanismos que constituem a barreira hematoencefálica. Figura gentilmente cedida por (Oller-Salvia et al. 2016).

À exceção de pequenas moléculas lipofílicas, que difundem livremente através das células endoteliais a favor do seu gradiente de concentração, a passagem de moléculas com origem na periferia através da BHE requer a presença de transportadores ou recetores específicos (ex: glicose, aminoácidos, insulina). Mecanismos semelhantes permitem a saída para a periferia de moléculas resultantes do metabolismo cerebral (ex: glutamina, peptídeos -amilóide).

### 1.2.2 Disrupção da barreira hematoencefálica

O conceito de uma disfunção da BHE como pré-requisito para o desenvolvimento da EM não é recente (Dodelet-Devillers et al. 2009), não se sabe porém se esta disrupção antecede o início da doença ou se é consequência da infiltração celular no SNC. A disrupção da BHE pode ocorrer pela elevada migração de glóbulos brancos do sangue para o SNC, por lesões no revestimento dos vasos sanguíneos ou por malformação vascular resultando numa fragilidade pouco comum com um aumento permanente da permeabilidade da BHE. Em doentes de EM, as alterações das barreiras vasculares ocorrem não só a nível cerebral como da espinal medula (Waubant 2006). Uma consequência da disrupção da BHE é a perda transitória ou crónica da impermeabilidade da barreira facilitando a passagem de células para o SNC (Ortiz et al. 2014).

Na EM pensa-se que a disfunção da BHE seja transitória, embora a recorrência possa ser observada para as mesmas ou diferentes localizações dentro do intervalo de semanas, meses ou mesmo anos. A evolução e desenvolvimento da lesão são irregulares e envolvem fases adicionais de disfunção da BHE, desmielinização imuno-mediada e vários graus de transecção axonal. É sabido que, durante os processos infecciosos e neuroinflamatórios ocorre modificação da expressão e organização das proteínas juncionais (Cassan e Liblau 2007; Nair et al. 2008).

### **1.2.2.a Transmigração das células do sistema imune através da BHE**

O acesso de células imunes ao SNC é restrito, mas não proibido; o processo de invasão de leucócitos, passo crucial na resposta inflamatória, envolve a migração de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido alvo (diapedese), onde exercem a sua função efetora. A passagem de leucócitos resulta da ação conjunta de recetores de adesão celular, fatores quimiotáticos e envolve mudanças morfológicas drásticas quer dos leucócitos quer das células endoteliais (Wilson et al. 2010). Os leucócitos na corrente sanguínea contactam com a parede vascular e aderem fortemente iniciando a resposta inflamatória. Num processo sequencial, os leucócitos iniciam o rolamento sobre o endotélio ativado, seguido de adesão firme e migração transendotelial (Hernandez-Pedro et al. 2013). O rolamento sobre a superfície endotelial favorece subseqüentes interações mediadas por moléculas de adesão celular (CAM) e os seus ligandos, aumentando a adesão dos leucócitos. O mecanismo de migração transendotelial através da BHE é um processo multi-passo, caracterizado por uma série sequencial de etapas que seguem o paradigma da diapedese/extravasão controlada das paredes vasculares (Barreiro 2009).

Como exemplo de moléculas envolvidas na migração transendotelial de leucócitos temos as moléculas de adesão celular vascular (VCAM) e as moléculas de adesão intercelular (ICAM), expressas principalmente em células endoteliais; 4 integrina (VLA-4 antigénio de função tardia) e o antigénio funcional de leucócitos (LFA-1 antigénio de função associada aos leucócitos), expressos em células T. A ligação reversível da célula T com o endotélio através de ICAM-1/LFA-1 e dos complexos VCAM-1/VLA-4 são potenciados por quimiocinas (Holman et al. 2011). As seletinas (P, E e L) são glicoproteínas transmembranares que também estão envolvidas neste processo de migração transendotelial. A L-seletina é expressa pela maior parte dos leucócitos,

enquanto as formas E e P são expressas nas células endoteliais ativadas por estímulos pró-inflamatórios. A localização da L-seletina nos leucócitos é obrigatória nos locais de inflamação, enquanto a P- e E-seletina desempenham papéis complementares na regulação das interações leucócito-endotélio. A glicoproteína ligando-1 P-seletina (PSGL1) é o maior ligando proteico destas três seletinas (Alvarez et al. 2011; Hernandez-Pedro et al. 2013). De facto, a ligação de PSGL1 e E-seletina promove a interação de leucócitos com o endotélio. Já a ligação de PSGL1 a L-seletina permite interações leucócito-leucócito, num processo designado por recrutamento secundário, em que os leucócitos aderentes facilitam a captura de outros leucócitos circulantes em zonas onde o endotélio apresenta inflamação, independentemente do facto de essas células expressarem ligandos para as seletinas endoteliais (Nair et al. 2008). Além da PSGL1, as seletinas podem também ligar-se a outras glicoproteínas, tais como CD44 ou ligando-1 E-seletina (ESL1) no caso de E-seletina. Cada ligando particular parece ter uma função distinta durante o processo de captura de leucócitos. Assim, a PSGL1 está envolvida no rolamento inicial dos leucócitos ao passo que ESL1 é necessária para converter o rolamento inicial e transitório em rolamento mais lento e mais estável. Finalmente, o CD44 controla a velocidade de rolamento e intervém na polarização da PSGL1 e L-seletina, provavelmente permite rolamento secundário (Barreiro 2009). No cérebro, em condições normais a P-seletina é preferencialmente expressa em vasos das meninges e do plexo coróide e é regulada positivamente em toda a vasculatura do SNC após neuroinflamação. Em oposição, a expressão da E-seletina é observada apenas em vasos das meninges, mas não no parênquima em condições inflamatórias (Alvarez et al. 2011). Apesar das seletinas e dos seus ligandos mostrarem uma tendência de interação com afinidade variável, a alta frequência de associação-dissociação permite mediar interações lábeis e transitórias entre leucócitos e endotélio.

Grande parte das CAMs são expressas por mais que um tipo de células, o que diminui a sua potencial especificidade como marcadores de disrupção da BHE. Acresce que a expressão das CAMs é sobre-regulada na superfície da célula, em parte por citocinas pró-inflamatórias, sendo libertadas como produtos séricos solúveis. *In vivo*, as CAMs solúveis são detetáveis no soro e no LCR refletindo os níveis de expressão da superfície celular.

Vários estudos têm avaliado a expressão de CAMs no soro e LCR de doentes de EM como potenciais marcadores de disfunção da BHE (Hartung et al. 1993; Sharief et al. 1993; Rieckmann et al. 1994; Hartung et al. 1995; Mossner et al. 1996; Trojano et al.

1996; Giovannoni et al. 1997; Rieckmann et al. 1997; Losy et al. 1999; Minagar et al. 2001). Os principais marcadores alvo de estudo foram: CD54, molécula-1 de adesão intercelular solúvel (sICAM-1); CD106, molécula-1 de adesão celular vascular solúvel (sVCAM-1); CD62 (seletinas L, P e E) solúvel; CD31 e CD51, micropartículas endoteliais (EMPs) (Waubant 2006). Contudo, nenhuma das CAMs se mostrou específica ou altamente preditiva de rutura da BHE, apesar de níveis aumentados terem sido relatados em doentes de EM, existindo uma sobreposição significativa quer com os valores normais quer comparativamente a doentes de EM não-ativos. Em oposição as micropartículas endoteliais ao contrário de outras CAMs parecem refletir mais diretamente o estado do endotélio da BHE em EM como células endoteliais cerebrais ativadas por citocinas e quimiocinas libertando EMPs para o plasma (Minagar et al. 2001).

Alguns estudos, tendo em conta os subtipos da doença, mostraram um aumento do nível de E-seletina sérica em doentes com esclerose múltipla primária progressiva (EMPP), contudo o mesmo não se revelou, no soro de doentes de EM surto-remissão (EMSR) ou EM secundária progressiva (EMSP), (Giovannoni et al. 1996; McDonnell et al. 1999). Também, doentes de EM primária progressiva com elevados níveis séricos de E-seletina apresentaram uma progressão mais rápida da incapacidade (Ukkonen et al. 2007). Em oposição outros estudos demonstraram que a E-Seletina solúvel (sE-Seletina) não está elevada em doentes de EM ou aumentada durante a atividade da doença (Rieckmann et al. 1994; Hartung et al. 1995).

Relativamente à ICAM-1 verificou-se um aumento no sangue e LCR em doentes EMPP em comparação com os controlos. Além disso, os níveis de ICAM-1 no sangue e LCR, em doentes EMPP, foram superiores comparativamente a doentes EMSP, e ainda, o nível de VCAM-1 foi maior apenas no sangue (Iwanowski e Losy 2015).

Duran e colaboradores em 1999 descobriram que a expressão superficial de moléculas de adesão, de leucócitos e os níveis séricos de moléculas de adesão solúveis no sangue periférico de doentes EMPP, diferem claramente dos doentes EMSR ou EMSP (Duran et al. 1999). Estes estudos demonstraram um aumento dos níveis de sICAM-1 e L-seletina em doentes EMSR ou EMSP, mas não em doentes EMPP onde se registou um padrão similar ao observado em controlos saudáveis. Estes resultados procuram explicar o porquê de as lesões cerebrais serem menores em número e tamanho em doentes EMPP

comparativamente aos outros subtipos/formas clínicos. Os resultados também indicam que ocorreu disrupção da BHE nos doentes EMSR e EMSP correlacionando-se com o aumento do número de lesões inflamatórias cerebrais. Além disso, as formas progressivas são caracterizadas por desmielinização disseminada e alterações degenerativas difusas ao longo de toda a substância branca e cinzenta contrastando com as lesões focais ativas, principalmente na substância branca ocorrendo na forma EMSR (Kutzelnigg et al. 2007; Bramow et al. 2010).

Estas investigações suportam a heterogeneidade imunológica de interações distintas entre células endoteliais e leucócitos ocorridas nas diferentes formas clínicas de EM. A ampla diversidade pode, em parte, explicar alguma da ineficácia de terapias modificadoras da doença (DMTs) em doentes EMPP, devido ao baixo grau de resposta inflamatória e relativamente intacta BHE, fora do controlo do sistema imune periférico (Leary e Thompson 2003).

### **1.2.2.b Metaloproteinases da matriz e seus inibidores tecidulares**

Após a migração transendotelial dos leucócitos, a passagem para o parênquima cerebral implica a travessia pela membrana basal e matriz extracelular, através da ação das metaloproteinases da matriz (MMPs).

As MMPs representam uma ampla família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco conhecidas pela capacidade de degradar os componentes da MEC (Zhang et al. 2010) e secretadas por uma variedade de tipos celulares (Bar-Or et al. 2003). Atualmente são conhecidas 23 MMPs, divididas em: gelatinases (MMP-2 e -9), que degradam o colagénio e a gelatina desnaturada; collagenases (MMP-1, -8, -13 e -18), que digerem a tripla hélice do colagénio; estromelinas (MMP-3, -10 e -11), que degradam as proteoglicanas; matrilisinas (MMP-7 e -26), que digerem proteoglicanas, fibronectina e laminina; metaloproteinases tipo membrana (MMP-MT), (MMP-14, -15, -16, -17, -24 e -25), que além da gelatina degradam fibronectina, agrecana e outros substratos da MEC e, por fim, outras MMPs (MMP-11, -12, -19, -20, -21, -23a, -23b, -27 e -28) com capacidade de degradar todos os constituintes da MEC e proteínas do tecido conjuntivo. Todas as MMPs são secretadas na forma de proenzimas e requerem ativação extracelular (Wright e Harding 2009; Kupai et al. 2010). Estudos *in vitro* indicam que a MMP-2 é capaz de ativar a MMP-9 (Fridman et al. 1995). Ambas as enzimas se reforçam mutuamente e

também partilham uma série de substratos, incluindo colagénio desnaturado ou gelatina (Van Den Steen et al. 2002).

A síntese de MMPs é regulada principalmente ao nível da transcrição, enquanto a sua atividade proteolítica é controlada através da ativação de proenzimas e a inibição de enzimas ativas por inibidores endógenos como  $\alpha_2$ -macroglobulina e inibidores tecidulares das metaloproteínas (TIMPs) (Nagase e Woessner 1999; Clark et al. 2008). São conhecidos quatro membros da família TIMP e apresentam uma relação de 1:1 nos complexos não covalentes que formam com as MMPs, bloqueando o acesso de substratos ao local catalítico da MMP. Os TIMPs são altamente específicos para as MMPs em geral, mas não para qualquer MMP em particular. TIMP-1 é uma proteína indutível e TIMP-2 uma proteína constitutiva e, ambos são solúveis e amplamente distribuídos (Gomez et al. 1997; Borkakoti 1998; Bode et al. 1999).

MMPs e TIMPs participam em numerosos processos fisiológicos como cicatrização, implantação do blastocisto, e angiogénese bem como processos patológicos como a artrite, infiltração tumoral e disseminação metastática (Birkedal-Hansen et al. 1993). O equilíbrio entre as MMPs e os TIMPs regula a digestão da matriz e membranas extracelulares, e conseqüentemente, a migração de leucócitos para o SNC e outros órgãos.

A MMP-2 também conhecida como gelatinase A ou colagenase tipo II, é secretada na forma de proenzima não-glicosilada com 72 kDa (pro-MMP-2), contendo um domínio pro de 80 aminoácidos e uma região madura com 551 aminoácidos (Collier et al. 1988). O domínio pro-MMP-2 contém um motivo de cisteína que está conservado em MMPs e mantém a MMP-2 em estado latente (Van Wart e Birkedal-Hansen 1990). A remoção do domínio pro-MMP-2 pode ser iniciada por MMPs-MT ou por proteases trombina serina e proteína C ativada (Toth et al. 2000; Zhao et al. 2004). A enzima madura e ativa caracteriza-se por um domínio catalítico interrompido por três domínios de fibronectina tipo II contíguos a um domínio C-terminal de hemopexina (Collier et al. 1988).

A MMP-2 desempenha um importante papel na inflamação e imunidade em associação com a função fisiopatológica na degradação e remodelação da MEC. É sabido que a ação da MMP-2 colabora na disrupção da BHE, facilitando a transmigração das células imunes para o SNC e o desenvolvimento da EM (Galboiz et al. 2001; Benesova et al. 2009; Shiryayev et al. 2009). Contudo, o conhecimento do comportamento da MMP-2 e respetivo inibidor tecidular (TIMP-2) na EM é ainda bastante reduzido. Foi demonstrado que os

monócitos de doentes de EM apresentam TIMP-2 aumentado (Mirshafiey et al. 2014). A razão sérica MMP-2/TIMP-2 pode representar um bom indicador para monitorizar doentes de EM em fase de recuperação (Fainardi et al. 2009). Segundo Benesová e colaboradores registaram um aumento dos níveis de MMP-2 no soro, bem como da razão MMP-2/TIMP-2 em doentes EMPP e EMSP comparativamente aos EMSR. Este aumento também estava associado com o acréscimo da incapacidade do doente e severidade da doença (Benesova et al. 2009).

Alguns trabalhos mostraram uma regulação positiva da MMP-2, não só em placas típicas de EM, mas também, na substância branca com aparência normal adjacente às placas (Maeda e Sobel 1996; Anthony et al. 1997).

A MMP-9 também conhecida como gelatinase B ou colagenase do tipo IV é secretada por neutrófilos, macrófagos e células modificadas na forma zimogénica (Ogata et al. 1992), com 92 kDa (Matrisian 1992; Birkedal-Hansen et al. 1993), apresentando três domínios de fibronectina do tipo II, um domínio semelhante a hemopexina e um domínio rico em prolina colagénio tipo V (Wilhelm et al. 1989; Birkedal-Hansen et al. 1993). A pro-MMP-9 pode ser ativada por MMP-3 (Ogata et al. 1992) ou por certas proteases bacterianas (Okamoto et al. 1997). MMP-9 é inibida por  $\alpha$ 2-macroglobulina ou por TIMP-1 (Ogata et al. 1992; Birkedal-Hansen et al. 1993). No SNC, a MMP-9 pode ser expressa em células do endotélio vascular, nas meninges, na microglia, em astrócitos e em células inflamatórias (Kawasaki et al. 2008).

A concentração da MMP-9 é considerada um marcador laboratorial inespecífico da inflamação. Vários estudos envolvendo doentes de EM revelaram níveis séricos de MMP-9 mais elevados em EMSR e EMSP comparativamente aos controlos (Lee et al. 1999; Waubant et al. 1999a; Avolio et al. 2003; Waubant et al. 2003). Contudo, TIMP-1, o principal inibidor da MMP-9, não se mostrou aumentado em relação a MMP-9, sugerindo um desequilíbrio no sentido de um aumento da atividade digestiva (Lee et al. 1999; Waubant et al. 1999a; Waubant et al. 2003). Assim, a razão MMP-9/TIMP-1 parece evidenciar uma melhor quantificação da atividade proteolítica. De facto, um aumento considerável na razão MMP-9/TIMP-1 e nos níveis séricos de MMP-9 foi observado em doentes de EM nos grupos EMSR e EMSP (Benesova et al. 2009). No entanto, os níveis séricos sobrepõem-se significativamente entre doentes de EM e controlos, se bem que, em menor grau, quando se utiliza a razão (Waubant 2006). Também por métodos imunquímicos foram registados níveis elevados de MMP-9 no soro ou em leucócitos

(Sellebjerg et al. 2000). De registar que a diminuição sérica dos níveis de MMP-9 foi correlacionada com a redução do número de lesões em doentes de esclerose múltipla (Alexander et al. 2010). A nível cerebral, a expressão de MMP-9 parece encontrar-se aumentada em secções de cérebro com EM, como demonstrado por métodos imunohistoquímicos (Cuzner et al. 1996; Maeda e Sobel 1996; Cossins et al. 1997). Níveis elevados de MMP-9 no LCR foram também detetados por zimografia em doentes de EM, bem como, outras doenças inflamatórias do SNC (Gijbels et al. 1992). O valor preditivo da MMP-9, e do TIMP-1 pode ser mais forte em doentes EMSR *versus* EMSP (Waubant et al. 1999a; Waubant et al. 2003). De salientar que esta relação não foi observada para a MMP-2 e TIMP-2 (Waubant et al. 2003). Recentemente, Sato e colaboradores verificaram que, no LCR de doentes de EM em fase ativa, se verifica uma abundância das células T CCR2+ CCR5+, capazes de produzir osteopontina e MMP-9 e reativas à proteína básica da mielina (MBP) (Sato et al. 2012). Outros achados sugeriram que o subtipo CCR6- das células T (mas não o subtipo CCR6+) é muito abundante no LCR durante o surto e pode produzir níveis mais elevados de MMP-9 e IFN- (Zivkovic et al. 2007; Sato et al. 2012).

Um dos mecanismos de ação do interferão (IFN ), um dos fármacos aprovados para o tratamento de EM (ver secção terapêutica), é a diminuição da disrupção da BHE. Tal é conseguido através da diminuição dos níveis séricos de MMP-9 e ainda mais significativamente do aumento dos níveis de TIMP-1 em doentes de EMSR e EMSP, reajustando a razão MMP-9/TIMP-1 para valores normais (Trojano et al. 1999; Waubant et al. 2001; Waubant et al. 2003). É interessante notar que a ausência de uma diminuição da razão MMP-9/TIMP-1 durante o tratamento com IFN pode prever a ocorrência de lesões ativas (Waubant et al. 2003). Isto sugere que a razão MMP-9/TIMP-1 deve ser ainda avaliada como um indicador da resposta ao IFN (Waubant 2006). De facto, os níveis séricos da MMP-9 diminuem com a terapia com IFN (Comabella et al. 2009; Alexander et al. 2010; Yilmaz et al. 2012), correlacionando-se com a diminuição das lesões ativas durante o tratamento (Trojano et al. 1999; Avolio et al. 2005).

A transcrição do gene da MMP-9, localizado no cromossoma 20q13, é influenciada por dois polimorfismos identificados na região promotora. Estes são um polimorfismo de microsatélite CA<sub>n</sub> a partir da posição -90 (St Jean et al. 1995) e um polimorfismo de um único nucleótido (SNP) na posição -1562 com origem na substituição de C para T (Zhang et al. 1999). Estudos *in vitro* têm mostrado que esta substituição impede a ligação de uma

proteína repressora de transcrição nuclear para esta região do promotor do gene da MMP-9 e aumenta a atividade de transcrição em macrófagos, estando associada com o aumento da expressão da MMP-9 (Zhang et al. 1999). Deste modo, é razoável supor que tanto o polimorfismo -1562T como o polimorfismo microsatélite CA<sub>n</sub> podem ser fatores de risco genéticos para a EM.

Alguns estudos abordaram o potencial envolvimento do polimorfismo -1562 C/T, quer isoladamente ou em combinação com o polimorfismo microsatélite CA<sub>n</sub>, com a suscetibilidade para a EM. Nalguns destes trabalhos, uma associação do alelo T com o aumento da suscetibilidade para a EM em diferentes populações foi encontrada (Mirowska-Guzel et al. 2009; La Russa et al. 2010), enquanto outro estudo, mostrou uma diminuição significativa do alelo T em doentes de EM (Benesova et al. 2008). Em contradição, alguns autores argumentam que esses polimorfismos não estão associados com a suscetibilidade à EM (Nelissen et al. 2000; Nelissen et al. 2002; Zivkovic et al. 2007; Fernandes et al. 2009; Valado et al. 2017), como comprovado recentemente num estudo de meta-análise (Nischwitz et al. 2015). Entre os estudos positivos com o polimorfismo microsatélite CA<sub>n</sub>, a associação mais significativa foi obtida por Fiotti e co-autores, que encontraram nos portadores de repetições mais longas um risco mais elevado de EM associado com o início da doença numa idade mais precoce (Fiotti et al. 2004). Portanto, o impacto das variantes genéticas do gene da MMP-9 com a suscetibilidade para a EM permanece controverso e a sua possível influência no curso da doença é ainda desconhecida.

A relação entre os níveis da MMP-9 no sangue periférico e os polimorfismos -1562 C/T e microsatélite CA<sub>n</sub> foi abordada apenas em dois pequenos estudos (Mirowska-Guzel et al. 2009; Fernandes et al. 2012).

### **1.2.3 Imunopatologia: células T e B**

As lesões desmielinizantes da EM resultam de um processo inflamatório no qual interagem vários elementos do sistema imune inato e adaptativo. Do ponto de vista histológico caracterizam-se quatro tipos de lesões. O tipo 1 constitui uma inflamação perivenosa com definição nítida do limite da lesão e remielinização. O tipo 2 consiste numa desmielinização perivenosa com deposição de imunoglobulinas e componentes do complemento terminal na lesão e remielinização. As lesões tipo 3, apesar de mal definidas, mostram inflamação e evidenciam principalmente apoptose dos

oligodendrócitos. O tipo 4 caracteriza-se por inflamação perivenosa com lesão bem definida e perda de oligodendrócitos na normal aparência da substância branca. Geralmente, as características histopatológicas são semelhantes entre as várias lesões, no mesmo doente (Lucchinetti et al. 2000).

Nos últimos 10 anos, uma importante mudança tem vindo a ocorrer na investigação dos mecanismos imunopatológicos da EM, sugerindo que a EM não é apenas uma doença do sistema imune, mas que envolve igualmente a contribuição de fatores intrínsecos ao SNC. As células da microglia e macrófagos são as principais células do sistema imune inato existentes nas lesões de EM, onde atuam juntamente com as células T e B infiltrantes para causar neuroinflamação e dano axonal.

A mimetização da doença autoimune em modelos animais sugere um papel crítico das células T na patogénese da doença e tradicionalmente a EM é vista como uma doença autoimune mediada por células T CD4+, particularmente pelos linfócitos T helper (Th). A invasão imune será coordenada por linfócitos T helper, de fenótipo pró-inflamatório (Th1 e Th17), reativos contra antígenos (ags) da mielina apresentados diretamente, com produção de citocinas, ou indiretamente, por ativação macrofágica e microglial, sendo estas células capazes de destruir o parênquima encefálico. As células T helper reconhecem pequenos peptídeos de 9-17 aminoácidos à superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs), que expressam moléculas do complexo MHC classe II. Os linfócitos T CD4+ diferenciam-se em vários tipos de células Th em função do perfil de citocinas que libertam: (i) Th1 pró-inflamatórias produzem níveis elevados de IL-2, IL-12, TNF-alfa e IFN-gama; (ii) Th2 anti-inflamatórias libertam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-25; (iii) Th17 pró-inflamatórias, secretam níveis elevados de IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26 e níveis baixos de IL-9 e IFN-gama; (iv) Th22, que são uma combinação do fenótipo Th1, Th2, Th17 libertando IL-13, IL-22 e TNF-alfa (v) Th9, mais recentemente identificadas pela sua potente secreção de IL-9 (Dargahi et al. 2017). As células Th1 terão uma contribuição essencial para a EM, como promotoras da inflamação, estando presentes, assim como as citocinas pró-inflamatórias por elas produzidas, em níveis elevados nas zonas de lesão e com axónios desmielinizados proporcionando o aumento de surtos (Bielekova et al. 2000). Uma resposta Th2 tem sido, por seu lado, associada a fases de remissão nos doentes de EM, e tanto a IL-10 como a IL-4 são capazes de suprimir vários aspetos da resposta inflamatória Th1. Este paradigma Th1-Th2 é, contudo, insuficiente para associar um determinado fenótipo de células T CD4+ com fases ativas da doença e outro com fases de remissão. As células Th17

parecem desempenhar também um papel importante na indução da inflamação na EM, através da libertação de IL-17. Esta citocina está presente em níveis elevados nas lesões no SNC, no LCR e no soro de doentes de EM, e sabe-se que interfere com o processo de remielinização. Por seu lado, a indução e manutenção das células Th17 depende da expressão de IL-23 por macrófagos e células dendríticas. Em doentes de EM, a proporção de células Th17 no sangue periférico revelou-se aumentada durante o período de recidiva aguda (Brucklacher-Waldert et al. 2009; Durelli et al. 2009; Muls et al. 2012).

As células T CD8<sup>+</sup> foram mais recentemente implicadas na patogénese da EM. As células T CD8<sup>+</sup> clássicas (Tc1) reconhecem pequenos epítomos antigénicos 7-9-mer à superfície de APCs que expressam MHC1 (astrócitos, oligodendrócitos e neurónios, para além das células dendríticas e macrófagos), produzem IFN-gama e são positivas para granzima B, perforina e atividade citolítica (Huseby et al. 2012; Denic et al. 2013). As células T CD8<sup>+</sup> são muito abundantes no tecido do SNC e no LCR de doentes de EM, estando presentes tanto em lesões agudas como crónicas, apresentando um fenótipo mais ativado (CD8hi CD28<sup>-</sup> CD57<sup>+</sup>) (Rammohan 2009). Nalguns estudos histopatológicos, o número de células T CD8<sup>+</sup> supera o de células T CD4<sup>+</sup>, sugerindo que estas células citotóxicas serão o motor do processo inflamatório. As células T CD8<sup>+</sup> também poderão mediar diretamente os danos axonais observados nas lesões de EM, estabelecendo contacto direto com os axónios desmielinizados e libertando os seus mediadores citotóxicos (Wu e Alvarez 2011; Huseby et al. 2012). Estudos em humanos mostraram que as células T CD8<sup>+</sup> expressavam quimiocinas que penetravam no SNC ligando-se à  $\alpha$ 4 integrina (Ifergan et al. 2011) sintetizavam mediadores pró-inflamatórios como a linfotoxina e IL-17 (Buckle et al. 2003) e ainda a sua presença no cérebro e LCR estava correlacionada com lesão axonal aguda (Bitsch et al. 2000). Recentemente mostrou-se que as remissões da EM poderiam estar relacionadas com a perda de células T CD8<sup>+</sup> e a redução da autorregulação diferenciada (Cunnusamy et al. 2014).

O equilíbrio entre as células T helper e outros subtipos celulares de células T, particularmente as células T reguladoras (Treg), nos locais de inflamação é crítico para determinar a evolução da patologia dentro do SNC (Fletcher et al. 2010). As células Treg expressam CD25 e o transcrito do *FOXP3*, e são essenciais para controlar a autoimunidade, mediando a tolerância imunológica aos autoantígenos (Jäger e Kuchroo 2010; Dargahi et al. 2017). As células Treg adaptativas, incluindo Treg-1 e Th3 bem como vários subtipos de células Treg CD8<sup>+</sup> exercem as suas funções imunossupressoras através da secreção de IL-10 (Treg-1) e TGF- $\beta$  (Th3). De facto, a evidência clínica suporta a

noção de que grande parte da patogénese inicial da doença pode ser atribuída a uma redução da capacidade funcional das células Treg em circulação (Pellerin et al. 2014).

Diversas evidências apoiam um papel das células B e anticorpos na patogénese da EM (Hauser et al. 2008), desafiando o conceito de que a EM é uma doença unicamente mediada por células T ativadas (Owens et al. 2006). De facto, níveis aumentados de imunoglobulinas no LCR de doentes de EM, que aparecem como bandas oligoclonais após imunoeletroforese (ver secção 1.3.3a), é um dos aspetos mais característicos da doença (Link e Huang 2006). Ao longo dos anos, a implicação das células B na patofisiologia da EM incluiu: a identificação de anticorpos (acs) anti-mielina dentro de células fagocíticas em lesões de EM; a observação de que o padrão mais comum de desmielinização é caracterizado pela deposição proeminente de acs e de complemento; e as descrições mais recentes de coleções de células imunes ricas em células B nas meninges. Apesar da presença de clones de células B expandidos e da produção anormal de acs no SNC estarem bem estabelecidas na EM, os ags reconhecidos por estes acs são ainda pouco claros, e diferentes alvos têm sido propostos, como vírus, proteínas axogliais e glicolípidos. Um dos candidatos mais promissores foi a glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (MOG), com acs anti-MOG a serem descritos em lesões de EM (Genain et al. 1999) e elevados títulos de acs anti-MOG a serem reportados no soro e LCR de doentes de EM (Reindl et al. 1999). No entanto, é agora claro que estes autoanticorpos são comuns numa série de outras doenças desmielinizantes humanas, incluindo a encefalomielite aguda disseminada (ADEM) e a nevrite ótica (Willison e Linington 2012), podendo também estar presentes em controlos saudáveis (Lampasona et al. 2004). A presença de clones de células B em vários sub-compartimentos do SNC (LCR, parênquima e meninges) será indicativa de que a expansão clonal das células B, induzida por um ou mais ags desconhecidos, ocorre dentro do SNC (Obermeier et al. 2011). Algumas evidências mais recentes sugerem um fluxo mais dinâmico e bidirecional das células B entre o SNC e a periferia, sugerindo que a expansão clonal possa ocorrer nos dois compartimentos (Michel et al. 2015).

A observação que a deleção das células B por acs monoclonais anti-CD20 limita substancialmente a atividade da doença (ver secção 1.3.3c), tornou claro que os linfócitos B desempenham papéis importantes na cascata imunológica subjacente ao processo inflamatório na EM. As células B podem exercer múltiplas funções pro-inflamatórias: (i) diferenciam-se em células plasmáticas e produzem imunoglobulinas que podem processar ags para ativação de células T e/ou para a fagocitose por macrófagos; (ii) podem atuar

como APCs para células T autoreativas; e (iii) libertam citocinas pró (IL-6, IL-12, TNF) e anti-inflamatórias (IL-10) (Krumbholz et al. 2012). Algumas células B suportam as funções pró-inflamatórias de outras células através da produção de TNF-alfa, IL-6 e linfotóxina-alfa, enquanto células B produtoras de IL-10 e IL-35 possuem funções reguladoras anti-inflamatórias. Na EM, as células B parecem estar anormalmente polarizadas para um fenótipo mais pró-inflamatório. Uma série de características do SNC inflamado pode suportar a manutenção das células B, incluindo fatores solúveis que suportam a sobrevivência das células B e que são produzidos pelos astrócitos e microglia ativada, como por exemplo BAFF, IL-6, IL-10, e IL-15, todos eles com níveis aumentados no LCR de doentes de EM (Michel et al. 2015).

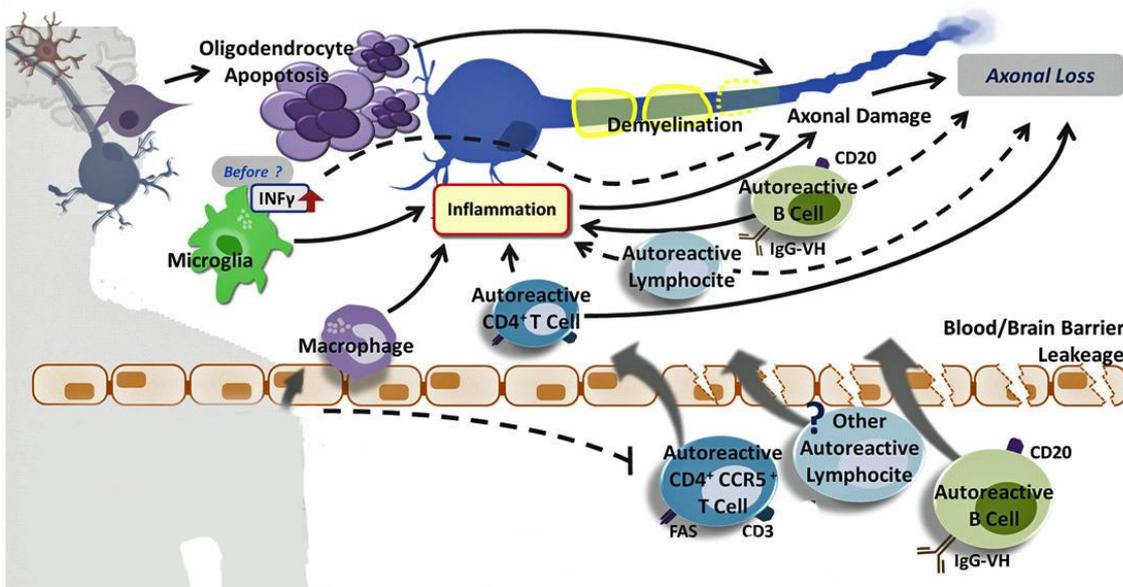
As células dendríticas conhecidas como as células mais potentes apresentadoras de antígeno e iniciadoras da resposta imune, têm um papel importante na fisiologia da EM. A ligação do ag à superfície celular das DCs induz ativação da própria, que ao comunicar com as células T CD4<sup>+</sup> estimula a resposta imune adaptativa, com produção de citocinas, quer pelos linfócitos, quer pelas próprias células dendríticas. Em doentes de EM as DCs apresentam um fenótipo ativado e após migração através da BHE diferenciam-se dentro do SNC e induzem a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> naïve em células pró-inflamatórias, dependendo da citocina presente no meio: na presença de IL-12 diferenciam-se em Th1 e com o predomínio de IL-23 diversificam-se em Th17. (Pashenkov et al. 2001; Serafini et al. 2006; Ifergan et al. 2008; Nuyts et al. 2013). Nos doentes de EM, as DCs encontram-se presentes nas lesões inflamatórias, no LCR e na circulação (Serafini et al. 2006; Ifergan et al. 2008; Nuyts et al. 2013), onde produzem níveis elevados de TNF-alfa, IFN-gama e IL-6. Além disso, a expressão pelas células dendríticas de moléculas co-estimuladoras CD40 e CD80 também se encontra aumentada nos doentes de EM, sugerindo que estas se apresentam num estado pró-inflamatório ativado.

Outras células de reconhecida importância são as APCs locais, como macrófagos e microglia que expressam moléculas MHC classe II e co-estimuladoras (Chastain et al. 2011). A distinção entre o fenótipo M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) nos macrófagos do tecido cerebral humano não é muito clara, estando presentes macrófagos M1 e de um subtipo intermediário M1/M2 (CD40<sup>+</sup>, CD206<sup>+</sup>) (Fumagalli et al. 2015). A microglia é considerada um componente essencial da resposta imune inicial. Tal como os macrófagos, as células da microglia podem estar polarizadas em fenótipos M1 (pró-

inflamatório, expressando CD40, CD74, CD86 e CCR7) e M2 (anti-inflamatório, expressando CD206 e CCL22) (Dargahi et al. 2017). Nas lesões de EM no cérebro, mais uma vez tal como os macrófagos, um fenótipo intermediário da microglia está presente, expressando CD40, CD74, CD86 e CCL22, mas não CD206 (Peferoen et al. 2015). Os macrófagos e a microglia ativada dominam a reação inflamatória em todas as lesões de EM e têm o potencial de induzir dano tecidual através de uma variedade de moléculas citotóxicas (Høglund e Maghazachi 2014). Destas, as mais relevantes incluem enzimas proteo e lipolíticas, citocinas citotóxicas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS). Os macrófagos e a microglia podem ser ativados nas lesões de EM pelas citocinas produzidas pelos linfócitos T ativados. No entanto, em estádios iniciais da lesão, pode ocorrer ativação macrofágica na ausência de um forte infiltrado de células T, sugerindo outros mecanismos de ativação. Assim, a estimulação dos macrófagos pela imunidade inata, por exemplo através da sinalização por *toll-like receptors* (TLRs), pode ser suficiente para induzir lesões desmielinizantes (Mallard 2012; Miranda-Hernandez e Baxter 2013). Por outro lado a microglia ativada no SNC também desempenha uma função protetora na depuração de células mortas e detritos, com papel fundamental nos processos de remielinização (Napoli e Neumann 2010; Miron et al. 2013; Yamasaki et al. 2014) e ainda, na produção de fatores de crescimento, tróficos e protetores para axónios e neurónios (Stadelmann et al. 2002).

### 1.2.4 Mecanismos de desmielinização e neurodegeneração

Os oligodendrócitos são células gliais especializadas que proporcionam suporte e isolamento aos neurónios do SNC, através do enrolamento, à volta do axónio, de múltiplas camadas concêntricas de membranas ricas em lípidos, estabilizadas por interações proteicas ó a bainha de mielina (Hauser e Oksenberg 2006). As principais proteínas da mielina incluem a proteína proteolipídica (PLP ó 50% do total), um grupo de isoformas da proteína básica da mielina (MBP ó 30% do total) e um grupo de proteínas menos abundantes como as MOG, CNPase e MAG (Cuzner e Norton 1996). Para além do suporte trófico, a bainha de mielina altera as propriedades elétricas do axónio, criando regiões de elevada resistência e baixa capacitância, facilitando a propagação rápida e saltatória do impulso nervoso entre regiões do axónio exposto, os nódulos de Ranvier (Waxman e Ritchie 1993; Irvine e Blakemore 2008).



**Figura 1.4** ó Inflamação periférica e cerebral em esclerose múltipla. Principais eventos da inflamação no SNC e a nível periférico relacionados com a progressão da doença. Figura adaptada e gentilmente cedida por (Macchi et al. 2015).

Diferentes mecanismos de desmielinização têm sido descritos, associados aos diferentes padrões de lesões na EM. A desmielinização ocorre principalmente através do dano das bainhas de mielina, nos padrões lesionais 3 e 4, sendo a morte dos oligodendrócitos o principal impulsor do processo desmielinizante (Lucchinetti et al. 2000). O dano direto da bainha de mielina será provocado pela libertação de mediadores tóxicos (e.g. TNF- $\alpha$ , óxido nítrico) por macrófagos ativados (Selmaj et al. 1991; Bitsch et al. 2000),

ou pela imunidade humoral (Genain et al. 1999; Lucchinetti et al. 2000). Já a desmielinização associada ao padrão 3 parece estar ligada a uma falência da atividade mitocondrial, que leva à morte dos oligodendrócitos, por exemplo através da libertação de fatores pró-apoptóticos, levando também à disrupção da diferenciação das células precursoras dos oligodendrócitos (Ziabreva et al. 2010). A falência mitocondrial, que parece afetar principalmente a citocromo C oxidase ó I e IV (Mahad et al. 2008), será induzida por ROS e RNS, libertados pela microglia ativada durante o *burst* oxidativo (Fischer et al. 2012).

Estas espécies reativas de oxigénio e nitrogénio induzem não só peroxidação lipídica, afetando a estrutura do ADN e de polissacarídeos, mas reagem também com proteínas celulares através da nitrosilação de resíduos de tirosina. O excesso de oxidantes fragiliza também a função da BHE levando à reorganização das junções de oclusão e emparelhamento da ocludina (Kevil et al. 2001), bem como a remodelação do citoesqueleto, perda de integridade da BHE, e consequente extravasamento de leucócitos para o SNC (Van der Goes et al. 2001; Schreibelt et al. 2006). As ROS também ativam fatores de transcrição e vias quinase, como o NF- $\kappa$ B (Griendling et al. 2000; Kamata et al. 2002), poli-ADP ribose polimerase (Scott et al. 2001) induzindo genes inflamatórios, incluindo CAMs, MMPs, e sintase do óxido nítrico indutível (NOSi). Uma sobre-expressão da NOSi foi descrita nas lesões de EM e também no LCR de doentes de EM. Níveis elevados de peroxinitrito reativo foram observados em lesões ativas de EM agudas e crónicas (Bonda et al. 2010; Stefani et al. 2012). Também, metabolitos de óxido nítrico (NO) e produtos de peroxidação lipídica revelaram-se significativamente elevados no soro de doentes com EM (Ortiz et al. 2009). Os níveis dos produtos finais do metabolismo do NO no LCR também se encontram associados à ocorrência de sintomas clínicos, propondo que o NO desempenha um importante papel inflamatório na disfunção da BHE (Giovannoni et al. 1998; Ortiz et al. 2014).

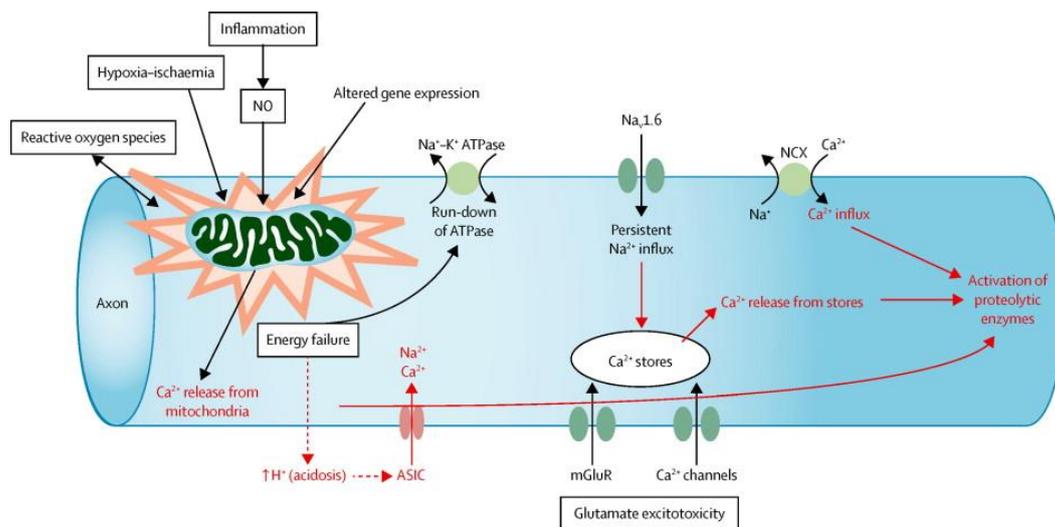
A visão tradicional neuropatológica da EM aponta a perda da mielina como o evento chave que leva à disrupção da propagação dos potenciais de ação ao longo das regiões expostas do axónio e aos consequentes danos neurológicos. No entanto, já desde os estudos histopatológicos iniciais, que foram descritos danos axonais substanciais em lesões ativas (Kornek e Lassmann 1999). De facto, estudos histopatológicos de alta resolução revelam axónios distróficos e transecção abundante em zonas de inflamação e desmielinização ativas, confirmando que a transecção axonal parcial ou total tem início em fases iniciais do processo patológico. Mais recentemente, os métodos imagiológicos

*in vivo* apoiam a noção de que a perda axonal e neuronal é responsável pela disfunção neurológica persistente que ocorre nos doentes de EM (Filippi e Rocca 2005).

O conhecimento dos mecanismos que levam ao dano axonal está longe de ser completo, e não é claro se a desmielinização é de facto um pré-requisito para a neurodegeneração na EM. A desmielinização resulta não só numa perda de suporte por parte dos axónios, mas também numa redistribuição dos canais iónicos, destabilizando o potencial de membrana axonal, reduzindo a excitabilidade e bloqueando a condução nervosa. A perda da bainha de mielina faz com que os canais de,  $\text{Na}^+$ , normalmente localizados nos nódulos de Ranvier se distribuam ao longo do axónio, alterando o tipo de condução de saltatória para propagação contínua, com consequente aumento do consumo de energia (Craner et al. 2004; Sedel et al. 2016) e incremento da atividade das mitocôndrias (Witte et al. 2009). Em condições de reduzida produção de ATP, a bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, que normalmente é responsável pela troca de  $\text{Na}^+$  pelo  $\text{K}^+$  extracelular, entra em falência, contribuindo para um aumento do  $\text{Na}^+$  intracelular. Como consequência, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , que normalmente troca o  $\text{Ca}^{2+}$  axoplásmico pelo  $\text{Na}^+$  extracelular, passa a funcionar em modo reverso, levando a um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do axónio e às subsequentes respostas degenerativas mediadas por este íão (Waxman 2006; Smith 2007). A acumulação excessiva de  $\text{Ca}^{2+}$  axoplásmico leva ao ciclo vicioso de propagação da disfunção mitocondrial, diminuição da produção de energia e comprometimento do transporte axonal (Mahad et al. 2008). Este desequilíbrio é normalmente designado hipóxia virtual e parece ser o mecanismo que explica a degeneração neuronal na EM (Trapp e Stys 2009; Luessi et al. 2012).

Em aparente contraste com o modelo de doença primária do oligodendrócito, algumas evidências apontam para o facto do dano axonal poder ser mediado diretamente por células inflamatórias residentes e infiltrantes e pelos seus produtos tóxicos solúveis. De facto, a microglia residente ativada é capaz de originar dano axonal através da libertação de mediadores como o NO e radicais livres de oxigénio, aminas vasoativas, complemento, proteases, citocinas e eicosanóides. De facto, lesões crónicas -inativas isto é, não-inflamatórias, e também substância branca de aparência normal em doentes de EM caracterizam-se pela presença de microglia ativada e concentrações elevadas de NO (Lassmann 2003). Além disso, os neurónios e axónios expressam moléculas MHC I, que os tornam vulneráveis a células T citotóxicas (Hoftberger et al. 2004). Algumas evidências sugerem ainda que o dano axonal pode ser mediado por anticorpos específicos dos axónios e pelo complemento (Zhang et al. 2005).

O processo de lesão axonal não é restrito a placas desmielinizantes na substância branca, mas também foi observado em substância branca e cinzenta aparentemente normal (Lassmann 2003; Kutzelnigg et al. 2007; Lassmann 2007; Lassmann et al. 2007). Novas e ativas lesões inflamatórias focais na substância branca estão presentes principalmente nas formas clínicas de surto-remissão (ver secção 1.3.2), em oposição à lesão difusa axonal da substância branca, aparentemente normal e desmielinização cortical, características das formas progressivas. Também, a atrofia da espinal medula e substância cinzenta no cérebro são mais proeminentes nas formas primariamente progressivas (Bieniek et al. 2006; Antel et al. 2012). As diferenças acima mencionadas parecem indicar que o processo neurodegenerativo é dominante nas formas progressivas de EM (Iwanowski e Losy 2015).



**Figura 1.5** ó Mecanismos de lesão axonal propostos na EM. Retirada de (Cicarelli et al. 2014), com permissão da Elsevier.

### 1.3 Aspectos clínicos da esclerose múltipla

A esclerose múltipla é uma patologia que sob o ponto de vista clínico é marcada por uma enorme variabilidade. A doença manifesta vários padrões, que se caracterizam pela presença de elevada diversidade de sinais e sintomas que condicionam um prognóstico muito imprevisível a longo prazo (Rudick et al. 1996).

### **1.3.1 Sintomas clínicos**

Segundo a visão do clínico, a complexidade da EM e a sua falta de previsibilidade podem levar a uma ampla gama de sintomas, que variam entre episódios agudos da doença e períodos de recuperação ao longo da progressão (Compston e Coles 2002; Kutzelnigg et al. 2005b).

Os sintomas da EM resultam da interrupção das vias mielinizadas do SNC, não se manifestando no sistema nervoso periférico (SNP). Os sintomas apresentados nesta patologia envolvem perturbações da visão, dos sistemas motor e sensoriais, da coordenação e equilíbrio, do intestino/bexiga/sexual, e da cognição (Zuvich et al. 2009). Dificuldades de visão podem incluir visão dupla, desfocada, cegueira em um ou ambos os olhos, dor e movimentos oculares bruscos. Problemas motores incluem paralisia parcial ou total, fraqueza muscular, rigidez, fala arrastada, e espasmos musculares ou tremores. Alguns indivíduos experimentam desconforto sensorial, tal como dormência (especialmente nas extremidades), perda de consciência, dor facial, choques elétricos e sensibilidade ao calor. Ataxia, náuseas, vertigem, e perda de capacidade na produção de movimentos alternados, reflectindo afeção de coordenação e equilíbrio. Dificuldades cognitivas incluem a depressão, a curto prazo ou a perda da memória a longo prazo, demência, alterações de humor e ansiedade. De entre os sintomas referenciados, os mais comuns, nas fases iniciais, incluem problemas visuais, espasticidade, dormência/formigueiro, disfunção do intestino/bexiga/sexual, depressão e fadiga (Noseworthy et al. 2000; Compston e Coles 2002; Hauser e Oksenberg 2006).

### **1.3.2 Curso clínico**

O curso clínico da EM é altamente incerto e os vários sintomas podem aparecer em cada um dos fenótipos/formas/subtipos clinicamente definidos: 55 a 85% dos doentes apresentam inicialmente a forma clínica EM surto-remissão (EMSR), caracterizada por ataques agudos de sinais e sintomas neurológicos, habitualmente conhecidos por surtos, novos ou recorrentes, seguidos de recuperação completa ou parcial. Biologicamente qualificam-se como áreas focais de inflamação e desmielinização, que se resolvem ao longo do tempo conduzindo à recuperação. Deste modo, a lesão causada pela inflamação é no mínimo parcialmente reversível. Com o tempo, 30 a 40% dos doentes com o subtipo EMSR convertem para a forma EM secundária progressiva (EMSP) curso secundário,

onde a incapacidade neurológica acumula progressivamente entre os surtos ou mesmo na ausência destes. Os indivíduos com a forma EMSP começam com deficiência reversível, mas por razões desconhecidas, a degeneração axonal conduz a lesões irreversíveis, que se apresentam clinicamente como incapacidade progressiva. Cerca de 10-15% dos doentes manifestam a forma clínica EM primária progressiva (EMPP), caracterizada pela constante incapacidade neurológica progressiva sem fases remissivas. Assim, os indivíduos com este subtipo clínico sofrem lesões irreversíveis que provocam uma progressão lenta desde o início com aumento da deficiência e com pouco ou nenhum alívio sintomático. A forma EM progressiva com surtos ocorre em cerca de 5% dos casos. Este subtipo clínico é caracterizado pela incapacidade progressiva a partir do início dos sintomas, muito semelhante à EMPP, mas também envolve ataques agudos ou surtos (Lublin e Reingold 1996; Hauser e Oksenberg 2006).

Tendo em conta a complexidade da EM os critérios clínicos têm sido alvo de modificações ao longo do tempo. Os avanços tecnológicos e a experiência clínica permitiram um maior e melhor conhecimento da patologia conduzindo a uma nova classificação fenotípica da esclerose múltipla recentemente publicada (Lublin 2014). Relativamente ao curso clínico da doença foram mantidos os principais fenótipos (surto-remissão e doença progressiva) da EM, descritos em 1996, sendo o fenótipo EMPP agora considerado parte do espectro da doença progressiva. As principais diferenças das revisões de 2013 foram, em relação às descrições dos cursos clínicos, a adição da síndrome clínica isolada (CIS), que é agora considerada como parte do espectro de fenótipos EM e deve ser seguida para determinar o curso subsequente da doença, e a eliminação da forma progressiva com surtos, sendo agora classificada como EM progressiva primária com atividade. No geral, todas as formas de EM devem ser sub-categorizadas em ativas e não ativas, recomendando-se também o uso direcionado dos termos "agravamento" (para doentes cuja patologia está a avançar devido a frequentes recidivas ou recuperação de recaída incompleta) e "progressão" (reservado a indivíduos numa fase progressiva com evidência de agravamento gradual ao longo do tempo) (Lublin 2014).

### 1.3.3 Diagnóstico

Na EM o diagnóstico é clínico e envolve alguns critérios essenciais como a necessidade de demonstrar a disseminação de lesões características de EM no espaço (DIS) e no tempo (DIT) e excluir diagnósticos alternativos.

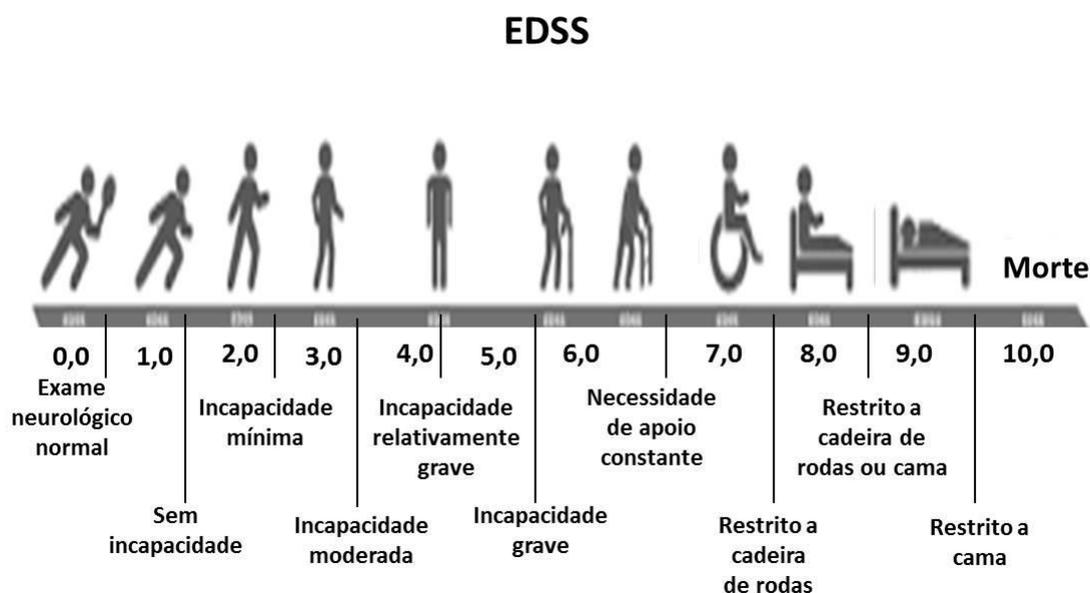
O diagnóstico de EM é efetuado num doente com uma clínica compatível e pressupõe os seguintes critérios: **1- critério de disseminação no espaço** (evidência de disseminação de lesões em pelo menos 2 locais do SNC) **2- critério de disseminação no tempo** ( $\times$  2 episódios distintos com intervalo  $\times$  a 30 dias) **3- exclusão de outras causas capazes de produzir quadro clínico semelhante**. Atualmente são utilizados os critérios de McDonald 2010 nos quais a Ressonância Magnética (RM) do crânio complementada ou não pela RM medular permite um diagnóstico mais rápido, por vezes logo no primeiro episódio clinicamente reconhecido (Polman et al. 2011). Por exemplo se na RM crânio encefálica (RMce) inicial, houver  $\times$  1 lesão captante de contraste indicativa de uma lesão recente e  $\times$  1 lesão não captante indicativa de episódio anterior é possível nos casos típicos efetuar o diagnóstico de EM. Contudo, as lesões objetivadas na RM, embora possam ter aspetos relativamente típicos de EM, não são específicas pelo que, para a prática clínica continua a ser importante o estudo do LCR, obrigatório nos casos menos típicos, e também para concretizar o critério 3. Nalguns casos, o clínico também recorre aos potenciais evocados para obter a demonstração de prolongamento da condução do impulso nervoso demonstrativo de um processo desmielinizante subjacente.

No caso das formas EM primárias progressivas o diagnóstico só poderá ser efetuado ao fim de 1 ano de evidência de progressão clínica num doente com  $\times$  2 dos seguintes critérios 1- RMce  $\times$  2 lesões; 2-RMmedular  $\times$  2 lesões; 3-LCR com bandas oligoclonais positivas (ver secção 1.3.3a). Em 2014 estes critérios foram complementados com a presença ou não de atividade da EM e a presença ou não de progressão clínica (Lublin 2014).

Se a evidência clínica não suporta o diagnóstico, os exames de RM constituem um forte apoio à clínica permitindo examinar lesões no cérebro e espinhal medula, tanto ativas como antigas (Poser et al. 1983; McDonald et al. 2001; Filippi e Rocca 2011). O apoio ao diagnóstico clínico originou uma nova designação esclerose múltipla clinicamente definida (CDMS) (Poser et al. 1983). Na sequência da disrupção da BHE, novas lesões são disseminadas em associação com inflamação perivenosa, detetadas pela extrusão de

*gadolinium* (Gd) através da BHE. Lesões da medula espinal estão frequentemente presentes e podem ser detetadas com elevada sensibilidade, bem como monitorizadas ao longo do tempo, usando RM (Hauser e Oksenberg 2006; Honce et al. 2015).

Uma vez diagnosticada a EM deve ser avaliado e quantificado o grau de incapacidade do doente, aplicando a escala *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) de Kurtzke, que mede a incapacidade em oito sistemas funcionais: piramidais, cerebelo, tronco cerebral, sensorial, vísceras e bexiga, visual, cerebral e outros. A escala oscila de 0,0 (exame neurológico normal) até 10,0 (morte devido à EM), ver Figura 1.6. Medidas 1,0-4,5 indicam um doente que é totalmente ambulatório, enquanto o intervalo 6,0-9,5 designa incapacidade significativa. Esta escala não é linear, alguns dos marcos importantes incluem; 6,0 necessidade de assistência unilateral; 6,5 requer assistência bilateral; e 7,0 restrito a uma cadeira de rodas (Kurtzke 1983).



**Figura 1.6** ó Expanded Disability Status Scale (EDSS). Figura adaptada de (Kurtzke 1983).

A escala de EDSS é uma excelente tentativa para quantificar o grau de incapacidade, apesar das suas desvantagens. É uma medida subjetiva que pode mudar com frequência, mesmo durante um único exame e não tem em conta a duração da doença ou a diferença nas taxas de progressão. Por exemplo, um doente com um valor de 5,0 após três anos tem um padrão muito diferente de progressão, relativamente a outro, com um valor de 5,0 passados 20 anos.

### 1.3.3.a Análise do líquido cefalorraquídeo

A análise do líquido cefalorraquídeo, embora tenha perdido algum peso nos atuais critérios de diagnóstico de EM, é ainda um importante teste auxiliar, especialmente em casos duvidosos. Através da análise do LCR, obtido por punção lombar (PL) é possível demonstrar o carácter inflamatório das alterações do SNC, componente essencial da EM.

Geralmente, na EM, o LCR não apresenta grandes alterações no exame citológico e químico de rotina, podendo apresentar ligeira pleiocitose, ( $< 50$  células/mm<sup>3</sup>), e hiperproteinorráquia (0,5 ó 0,7 g/l). O achado mais relevante na análise do LCR de doentes de EM é a produção local, intratecal, de imunoglobulinas (Ig), particularmente de imunoglobulinas do tipo G (IgG), habitualmente designadas por bandas oligoclonais (BOC) (Hauser e Oksenberg 2006).

As bandas oligoclonais correspondem à produção de anticorpos do tipo IgG, produzidos por clones de células B, em resposta a antígenos, ainda não identificados. Este é um processo característico das doenças inflamatórias do SNC, observando-se, em doenças autoimunes como a EM (Meinl et al. 2006; Awad et al. 2010).

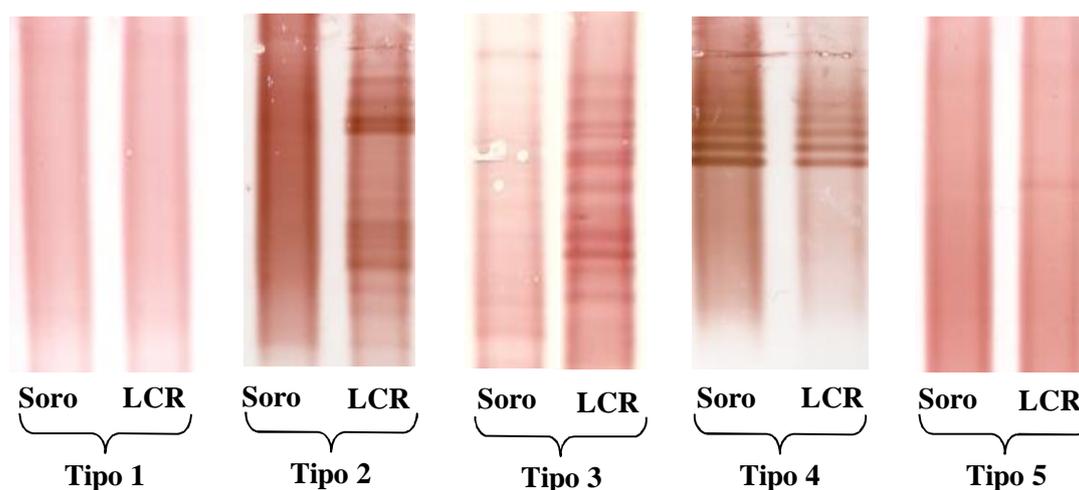
Apesar da falta de especificidade, o achado de BOC restritas ao espaço subaracnoideu é o parâmetro *gold standard* no estudo do LCR para o diagnóstico da esclerose múltipla (Andersson et al. 1994; Thompson 1995; Caudie et al. 2000; Reiber et al. 2003).

O método que apresenta maior sensibilidade para detetar a produção intratecal de IgG é a focagem isoelétrica (FIE) seguida de imunodeteção da IgG (Keir et al. 1990). Para cada doente, na mesma corrida da FIE e imunodeteção são aplicadas amostras paralelas do par soro e LCR, com as mesmas quantidades de IgG, permitindo a comparação dos resultados (Andersson et al. 1994). Em indivíduos saudáveis, há síntese policlonal de IgG que passa do sangue para o LCR, o que confere uma coloração homogénea às corridas de FIE. Nos doentes de EM, sobreposto a este padrão difuso policlonal, surgem no LCR, mas não no soro, bandas mais carregadas, bem definidas, que indicam a presença de um processo imunológico ativo restrito ao SNC (ver Figura 1.7).

Apesar do diagnóstico da EM ser essencialmente clínico, a deteção de BOC no LCR constitui um resultado interessante para o diagnóstico. Relativamente à sensibilidade e especificidade das BOC IgG, por FIE, os estudos referem uma elevada sensibilidade com valores superiores a 90% e, quanto à especificidade são referidos valores acima de 80% (Schwenkenbecher et al. 2016).

Na população Portuguesa, alguns trabalhos têm revelado valores de acuidade diagnóstica semelhantes a estes. Um estudo realizado na região Norte do país apresentou valores de 82% e 79,9% para sensibilidade e especificidade, respetivamente (Sa et al. 2005), enquanto outro realizado na região Centro revelou uma sensibilidade de 91% e uma especificidade de 84% (Batista et al. 2007).

De salientar que a presença de BOC por FIE não é específica de EM. Porém, funciona como diagnóstico diferencial, apenas quando outras causas conhecidas da inflamação do SNC foram excluídas. Assim, por exemplo a presença de BOC no par LCR/soro, encontrando-se em maior número no LCR que no soro pode ser observado em EM e em inflamação do cérebro em doenças sistémicas como sarcoidose. Também podem ser detetadas BOC no LCR e no soro, habitualmente em igual número, em inflamações sistémicas como a síndrome de *Guillain-Barré* (Andersson et al. 1994).



**Figura 1.7** Imagens digitalizadas dos 5 tipos de bandas oligoclonais IgG, obtidas por focagem isoelétrica e imunoblotagem, nos pares de amostras soro e LCR. Laboratório de Neuroquímica do CHUC. Tipo 1 é Negativo: ausência de BOC no LCR e no soro; Tipo 2 é Positivo: BOC restritas ao LCR; Tipo 3 é Maior que o: BOC no LCR e no soro, em maior número no LCR que no soro; Tipo 4 é Espelho: BOC idênticas no LCR e no soro; Tipo 5 é Paraproteína: monoclonal no LCR e no soro, com 1 banda. Adaptado de (Andersson et al. 1994).

### **1.3.4 Prognóstico**

Tendo em conta a variabilidade clínica da doença, o prognóstico da EM é muito incerto e representa um grande desafio para a investigação. Muitos estudos se têm realizado no sentido de identificar marcadores de prognóstico como os parâmetros demográficos (idade e sexo), bem como, clínicos (idade de início, sintomas iniciais) para uma orientação da terapêutica o mais adequada possível.

Alguns estudos sugerem a relevância das BOC IgG no prognóstico relativamente à conversão de CIS para CDMS. Num recente estudo de meta-análise a presença de BOC IgG aumentou o risco de um segundo surto, bem como a acumulação de incapacidade. No mesmo estudo 68% dos doentes com CIS, revelaram BOC positivas. Deste modo, concluiu-se que a presença de BOC IgG está associada ao aumento acentuado do risco de conversão para a forma CDMS, independentemente da localização anatómica do CIS ou de um resultado de incapacidade específico no seguimento de doentes com BOC negativas (Dobson et al. 2013).

De acordo com Tintore e colaboradores, 2015, nos doentes CIS as BOC estavam presentes em 57,2% dos casos, variando de 19% para os doentes com RM do crânio normal, e 73,5% para doentes com RM do crânio anormal. Este estudo confirma o importante papel das BOC no prognóstico e no acumular de incapacidade e, o mais relevante confirma que a presença de BOC permanece preditiva após o controlo de outros fatores demográficos, clínicos, DMTs e variáveis de RM. Deste modo, em doentes CIS os fatores de risco que desencadeiam mais surtos e acumulação de incapacidade podem ser categorizados, sendo a presença de BOC considerada um fator de prognóstico de médio impacto, a RM um fator de elevado impacto e as características demográficas e topográficas de baixo impacto (Tintore et al. 2015). Um estudo multicêntrico recente, envolvendo 33 centros e 1047 casos CIS, corroborou a relevância das BOC IgG e a idade no prognóstico relativamente à conversão de CIS para CDMS (Kuhle et al. 2015).

As imunoglobulinas desempenham um papel essencial na fisiopatologia da EM e as IgG foram descritas como ativadoras do complemento nas lesões desmielinizantes (Lucchinetti 1996; Lucchinetti et al. 2000; Barnett et al. 2009) e na degeneração da bainha de mielina (Lucchinetti 1996), contribuindo para a destruição axonal (Mead et al. 2002). Vários estudos têm efetivamente tentado demonstrar uma associação entre a presença de BOC IgG e a progressão da incapacidade na EM, mas os resultados têm sido discrepantes.

Se nalguns casos foi possível demonstrar um melhor prognóstico de incapacidade nos doentes sem BOC IgG, consistente com um papel da síntese intratecal de IgG para o processo da doença (Avasarala et al. 2001; Annunziata et al. 2006; Joseph et al. 2009), noutros trabalhos não foi possível encontrar nenhuma diferença na severidade da doença em doentes com e sem BOC IgG (Siritho e Freedman 2009), apesar da presença de BOC IgG se correlacionar com outros marcadores de inflamação aguda, especialmente nas formas EMSR. Outros estudos ainda demonstraram que, pelo contrário, a ausência de BOC IgG estava associada a um curso clínico mais severo, com maior incapacidade e pior prognóstico (Idiman et al. 2009).

Durante a última década, vários trabalhos têm apontado para a presença de BOC do tipo IgM, restritas ao SNC, como um indicador de prognóstico na EMSR, com os doentes que possuem BOC IgM a apresentarem um curso de doença mais agressivo (Villar et al. 2002a; Villar et al. 2003). As BOC IgM ocorrem no LCR em cerca de 40% dos doentes de EMSR (Villar et al. 2002a), e parecem relacionar-se com os principais fatores de prognóstico como: a taxa de surtos (Villar et al. 2005a); o aumento do valor do EDSS nas formas de EM clinicamente definidas, na presença de BOC IgM positivas (Villar et al. 2002a); o tempo para atingir um EDSS de 4,0 (Thangarajh et al. 2008) ou de 6,0 (Villar et al. 2002b; Villar et al. 2003); a probabilidade de conversão para formas progressivas (Villar et al. 2002a; Villar et al. 2002b; Villar et al. 2003; Villar et al. 2005a); o aumento da atrofia cerebral precoce e o aumento das lesões na RM em T2 (Magraner et al. 2012). Também nos doentes com CIS, a presença de BOC IgM restritas ao SNC parece ser relevante, conferindo um maior risco de conversão para CDMS (Villar et al. 2002b) e diminuindo o tempo para um segundo surto (Bosca et al. 2010).

As BOC IgM geralmente persistem durante o curso da doença, como comprovado por Villar e colaboradores em 2003, quando após uma segunda punção lombar os doentes mantiveram a pesquisa de BOC IgM positiva (Villar et al. 2003). Também a síntese intratecal de IgM lípido específica aponta para uma resposta imune persistente, manifestando um curso da EM mais agressivo com aumento do número de surtos e do valor de EDSS, em oposição à presença de BOC IgM não lípido específica que apresenta um curso mais benigno (Villar et al. 2008). Esta resposta é geralmente produzida por linfócitos B do tipo CD5+, que se encontram aumentados no LCR de doentes com BOC IgM (Villar et al. 2005a) e ainda, células B CD19+ cuja percentagem está elevada nas IgM lípido específicas (Villar et al. 2008). Na maior parte dos doentes de EM, as BOC

IgM são dirigidas contra lípidos da mielina, sendo a fosfatidilcolina o antigénio mais frequentemente reconhecido (Villar et al. 2005a). No entanto, ainda não foi provado quais as células alvo dos anticorpos IgM, uma vez que os lípidos identificados são expressos à superfície de vários tipos de células, e tanto a mielina como os axónios partilham uma elevada composição antigénica lipídica (De Vries et al. 1981).

A razão pela qual os auto-anticorpos IgM estão associados a um pior prognóstico não se encontra ainda totalmente esclarecida. No entanto, é sabido que as IgM são as imunoglobulinas mais eficientes na fixação do complemento. De facto, depósitos de IgM foram encontrados em axónios desmielinizados, oligodendrócitos e macrófagos presentes em lesões de EM, colocalizando-se com o componente C3b do complemento (Sadaba et al. 2012). Assim, a exacerbação da doença associada à presença destes anticorpos pode ser devida não só a uma indução da desmielinização dependente do complemento, a uma estimulação da fagocitose da mielina por macrófagos e microglia através de recetores Fc e de complemento, mas também a um efeito direto no dano axonal. Estudos recentes mostram que os doentes com BOC IgM apresentam níveis mais elevados de neurofilamentos no LCR, (Villar et al. 2015), mesmo em fases muito iniciais da doença, apoiando assim um papel direto dos anticorpos IgM na destruição axonal, e explicando a associação verificada entre estes anticorpos, a progressão da severidade e atrofia cerebral na esclerose múltipla (Thangarajh et al. 2008; Magraner et al. 2012).

A associação das BOC IgM específicas para lípidos com um curso mais agressivo da doença poderá ser útil na identificação dos doentes candidatos à implementação precoce de terapêuticas imunomoduladoras (Garcia-Barragan et al. 2009). Recentemente foi ainda sugerido que a presença destes anticorpos no LCR poderia estar associada a um menor risco de desenvolvimento de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML) durante o tratamento com Natalizumab (Villar et al. 2015).

Apesar do elevado número de trabalhos a apoiar o papel das BOC IgM como um fator de prognóstico da EM, e do método usado para a sua determinação (focagem isoeléctrica seguida de imunofixação) ter sido sujeito recentemente a uma validação multicêntrica (Espino et al. 2015), nem todos os estudos são concordantes. Sola P e colaboradores em 2011, mostraram que a síntese de IgM foi preditiva de maior severidade da doença para as formas EMSR e EMSP, contudo na EMPP a sua presença era rara e não influenciou o curso da doença (Sola et al. 2011). Há de facto alguns trabalhos de outros grupos, que não o grupo espanhol, que inicialmente descreveu este efeito e que é autor da grande maioria dos estudos acima referidos, que não confirmam esta associação da presença de BOC IgM

restritas ao SNC com um curso mais agressivo da doença (Schneider et al. 2007). Além disso, particularmente para o efeito da presença destes anticorpos no risco de conversão de CIS para CDMS, os estudos existentes englobam grupos pequenos de doentes (Villar et al. 2002b; Ferraro et al. 2013), e a replicação em populações maiores e independentes é ainda necessária.

Embora, as bandas oligoclonais IgM sejam os marcadores de prognóstico mais aceites, outros parâmetros têm sido propostos pela comunidade científica, sendo os mais relevantes, provavelmente, os neurofilamentos. Estes apresentam três cadeias com diferente peso molecular: neurofilamento de cadeia pesada (NFH) com 190 a 210 kDa, neurofilamento de cadeia intermédia (150 kDa) e neurofilamento de cadeia leve (NFL), 68 kDa (Teunissen e Khalil 2012). A maior parte dos estudos tem incidido nos NFL no LCR, que para além de terem demonstrado resultados promissores como marcadores de prognóstico da conversão de CIS para CDMS (Teunissen et al. 2009; Teunissen e Khalil 2012), têm também sido investigados como marcadores precoces da progressão, quer nas formas EMSR (Salzer et al. 2010; Hakansson et al. 2017) quer nas formas progressivas (Trentini et al. 2014). Níveis elevados de NFH no LCR têm também sido apontados como preditores precoces de atrofia cerebral a longo prazo (Petzold et al. 2016). Por outro lado, tem sido sugerido que os NFL no LCR poderão funcionar como marcadores de monitorização da resposta à terapêutica com fingolimod (Kuhle et al. 2015) ou natalizumab (Gunnarsson et al. 2011; Kuhle et al. 2013). Extremamente promissores são também os estudos que reportam a quantificação longitudinal de NFL no soro como um potencial marcador das lesões de substância branca (Bergman et al. 2016) e de progressão da EM (Kuhle et al. 2016).

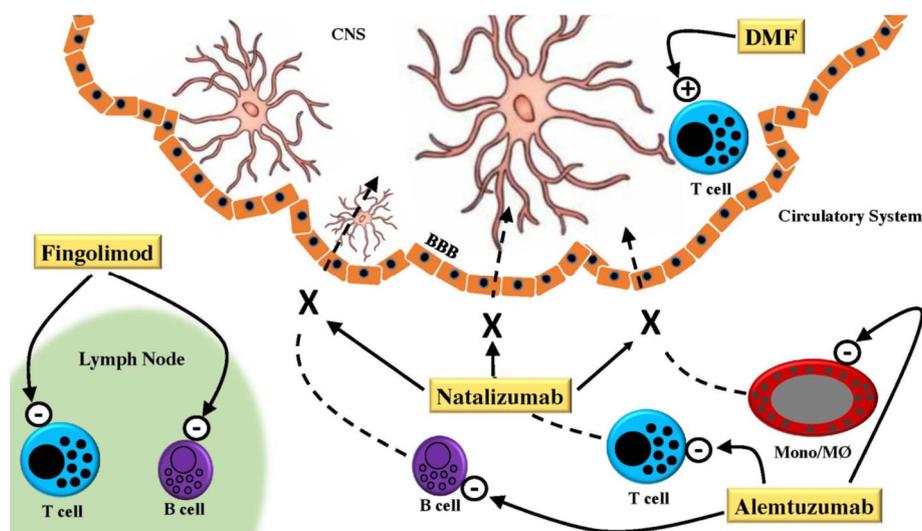
### **1.3.5 Terapêutica**

Até ao ano de 1993 o tratamento da EM estava limitado à terapêutica sintomática da doença, aquando da ocorrência de novos surtos ou agravamento significativo de alterações anteriores. Esta é feita com corticosteróides em doses elevadas (metilprednisolona endovenosa em doses de 500-1000 mg/dia, durante 3 a 5 dias), tendo como objetivo reduzir a gravidade e a duração dos sintomas (Durelli et al. 1986). Por vezes, é necessário recorrer à plasmáfereze, quando a sintomatologia do surto não cede aos corticosteróides (Keegan et al. 2002).

Durante a década de 90 surgem as terapêuticas modificadoras da doença (DMTs) com capacidade de alterar a história natural da doença, mas sem capacidades curativas. O seu papel é parcialmente eficiente na redução da gravidade e frequência dos surtos e na diminuição da progressão da incapacidade promovendo melhor qualidade de vida ao doente. Em meados da década de noventa surgem os primeiros injetáveis IFN e acetato de glatirâmero (GA), usados cerca de 20 anos como DMTs e consideradas terapias de primeira linha na forma surto-remissão (English e Aloï 2015).

Na última década tem-se assistido a uma rápida expansão na disponibilidade de DMTs para as formas surto-remissão da EM e desde 2004, novos fármacos foram aprovados quer pela Food and Drug Administration (FDA) nos EUA, quer pela European Medicines Agency (EMA) na Europa.

Na lista de DMTs atualmente aprovadas para tratamento da EMSR podemos encontrar fármacos que inibem a proliferação dos linfócitos ativados (teriflunomida), moduladores do recetor da esfingosina 1 fosfato (fingolimod), fármacos que combinam propriedades imunomoduladoras e neuroprotetoras (dimetilfumurato) e anticorpos monoclonais humanizados que inibem a migração dos linfócitos (natalizumab) ou provocam a sua depleção (alemtuzumab). As DMTs aprovadas pela EMA, seus mecanismos de ação, eficácia e efeitos secundários são apresentados na Tabela resumo 1.1, bem como na Figura 1.8, que ilustra os diferentes mecanismos de ação.



**Figura 1.8** Representação esquemática dos mecanismos de ação de 4 fármacos usados no tratamento da esclerose múltipla. No sistema circulatório o alemtuzumab tem como alvo o CD52, principalmente expresso em células T, células B e monócitos (Mono)/macrófagos (MØ) resultando na sua depleção; o natalizumab liga-se à  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrina nas células T, células B e Mono/MØ provocando uma reduzida migração através da BHE para o SNC; o fingolimod bloqueia a libertação de linfócitos ativados a partir dos nóduos linfáticos, direcionando os recetores de esfingosina1-fosfato. No SNC, o dimetilfumarato altera a produção de citocinas das células T que migraram para o SNC para um perfil Th2 e reforça a NRF2, com efeitos reguladores imunitários e citoprotectores em oligodendrócitos, neurónios e células gliais. Figura gentilmente cedida por (Al-Khamis 2016).

A vasta disponibilidade de fármacos é particularmente importante, porque a natureza e a severidade da doença são muito variáveis e também, porque os doentes diferem na tolerância ao risco, nas preferências e comorbilidades. A flexibilidade dos novos fármacos oferece opções de tratamento mais efetivas e permite escolhas mais individualizadas pelo médico e pelo doente. Com estes novos medicamentos, surgem contudo novas preocupações como: o mecanismo de ação, os dados de segurança e tolerabilidade de concentrações e requisitos de monitorização (Farber et al. 2016). De facto, os efeitos secundários associados a estas novas terapêuticas incluem, no caso do natalizumab, um aumento na suscetibilidade para a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), infeção oportunista do SNC originada pelo vírus *John Cunningham* (JCV). Assim, deve fazer-se a pesquisa dos anticorpos anti-JCV aos doentes antes de iniciar a terapêutica, sendo igualmente importante a duração do tratamento (Torkildsen et al. 2016). Relativamente ao alemtuzumab, aprovado apenas para formas ativas de EM,

são frequentes reações adversas de autoimunidade secundária a nível da tiróide, podendo mesmo evoluir para carcinoma. Outras patologias autoimunes podem surgir como anemia hemolítica autoimune, pancitopenia autoimune e purpura trombocitopénica imune (Cohen et al. 2012). Também são reportados casos de melanoma (Pace e Zajicek 2009).

**Tabela 1.1** ó Terapias modificadoras da doença atualmente aprovadas pela EMA para tratamento da esclerose múltipla

Terapias modificadoras da doença / Ano de aprovação	Terapia/ Administração	Mecanismo de ação	Eficácia	Efeitos secundários
<b>Acetato de glatirâmero / 1996</b>	1ª linha/ imunomodulador/ injetável	Efeitos anti-inflamatórios, promovendo uma passagem das células T CD4+ para um perfil Th2, libertando citocinas anti-inflamatórias (Torkildsen et al. 2016).	Redução da TAS em 29% vs PB; diminuição da atividade da EM, controlada por RM (Comi et al. 2001a).	Reação no local da injeção; reação sistémica e transitória de rubor e tórax apertado, por vezes acompanhada de palpitações, ansiedade e dispneia (Torkildsen et al. 2016).
<b>Interferão (IFN -1a / 1996; IFN -1b /1993, 2009; peginterferão -1a / 2014)</b>	1ª linha/ imunomodulador/ injetável	Propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas para linfócitos T e redução da migração de células inflamatórias através da BHE (Dhib-Jalbut e Marks 2010).	Redução da TAS em 30%-34% vs PB; redução da progressão da incapacidade; redução da atividade da doença controlada por RM (group 1993; Jacobs 1996; Ebers et al. 1998; PRISMS e G 2001).	Sintoma gripal, dores musculares, febre, calafrios, dor de costas e cabeça (Torkildsen et al. 2016). Possível indução de NABs, menos provável na terapia com IFN -1a (Sorensen et al. 2005).
<b>Teriflunomida / 2012</b>	1ª linha/ imunomodulador/ oral	Inibidor reversível da enzima dihidro-orotate desidrogenase (DHODH), com diminuição da síntese da pirimidina, etapa crucial na síntese de ADN, com subsequente efeito citostático sobre os linfócitos B e T (Gold e Wolinsky 2011).	Redução da TAS em 31%-36% vs PB; redução da incapacidade de progressão em 26%-27% vs PL; (O'Connor et al. 2011; Confavreux et al. 2014).	Infeções do trato respiratório e urinário, diarreia, náuseas, enfraquecimento do cabelo, neuropatia periférica e hipertensão. Potencial teratogénico (O'Connor et al. 2011; Confavreux et al. 2014).
<b>Dimetilfumarato / 2013</b>	1ª linha/ imunomodulador/ oral	Redutor da neuroinflamação e neurodegeneração por ativação da via antioxidante do fator nuclear (Nrf2) (Farber et al. 2016).	Redução da TAS em 48%-53%; diminuição da progressão da incapacidade em 34%-38% vs PB (Gold et al. 2012). Redução do número de novas lesões ou aumento das existentes (Gold et al. 2012).	Efeitos gastrointestinais: náuseas, vómitos e dor abdominal, rubor ou calor na face ou no tronco. Desconforto gastrointestinal (Farber et al. 2016).

*Marcadores biológicos na esclerose múltipla: relevância no prognóstico e terapêutica*

<b>Fingolimod /2010</b>	2ª linha/ imunossupressor/ oral	Atua no recetor da esfingosina 1 fosfato (S1P), retendo os linfócitos T nos nódulos linfáticos, reduzindo o número de linfócitos circulantes (Kappos et al. 2010).	Redução da TAS em 48%-55% vs IFN -1a; diminuição da progressão de incapacidade em 25%-30% e redução do nº de lesões em 50% (Cohen et al. 2010).	Hipertensão, bradicardia, bloqueio atrioventricular, edema macular, varicela, encefalite por herpes simplex. Contra-indicado em doentes com antecedentes cardíacos.
<b>Natalizumab / 2004</b>	2ª linha/ imunomodulador/ injetável	Anticorpo monoclonal anti- $\alpha$ 4 integrina, bloqueia a adesão de monócitos e linfócitos às células endoteliais da BHE e a sua subsequente transmigração para o SNC.	Redução da TAS em 68% vs PB; diminuição do risco de progressão de incapacidade em 42% (Polman et al. 2006).	Reação alérgica; neutralização dos anticorpos, seguida de perda da eficácia e aumento de eventos adversos relacionados com a perfusão; PML.
<b>Alemtuzumab / 2014</b>	2ª linha/ imunomodulador/ injetável	Anticorpo monoclonal recombinante humanizado para CD52, presente nos linfócitos B, T, células NK, monócitos e macrófagos, resultando na sua depleção (Farber et al. 2016).	Redução da TAS em 49%-55% vs IFN -1a 44 $\mu$ g e significativa melhoria na % de doentes sem surtos. Diminuição da progressão da incapacidade em 30%-42% (Cohen et al. 2012; Coles et al. 2012).	Rubor, náuseas, cefaleias, taquicardia, urticária, erupção cutânea, prurido, pirexia e fadiga associadas à perfusão (Coles et al. 2012). Aumento do risco de infeção do trato respiratório superior e do trato urinário e, doenças autoimunes (Torkildsen et al. 2016).
<b>Mitoxantrolina / 2000</b>	3ª linha/ imunossupressor	Bloqueia a síntese de ADN inibindo a proliferação e indução da apoptose de linfócitos T e B, macrófagos e células apresentadoras de antígenos (Torkildsen et al. 2016).	Redução da TAS em 60%-70% vs PB; redução da progressão da incapacidade e atividade da doença controlada por RM (Millefiorini et al. 1997; Martinelli et al. 2009).	Náuseas, fadiga, alopecia, amenorreia e infertilidade, infeções do trato urinário, risco de leucemias e toxicidade cardíaca. Efeito teratogénico.

BHE-barreira hematoencefálica; IFN -interferão beta; NABs-anticorpos neutralizantes anti-IFN $\beta$ ; Nk-natural killer cells; PB-placebo; PML- leucoencefalopatia multifocal progressiva; TAS-taxa anualizada de surtos; *vs-versus*.

Apesar do tratamento da EM ter beneficiado imenso com as novas opções do amplo arsenal de tratamentos disponíveis, e a eficácia destes novos fármacos ser amplamente superior à do IFN e do GA, o tratamento pilar da EM continua a assentar nestes dois fármacos, com registo de segurança mais longa e benigna (Farber et al. 2016). Assim, o uso dos novos fármacos encontra-se aconselhado apenas para doentes com formas agressivas de EMSR com progressão rápida ou como terapêutica de resgate em doentes em que outras DMTs tenham falhado (Tanasescu et al. 2013). Evidências recentes sugerem que a administração de DMTs deve iniciar-se o mais precocemente possível pela suscetibilidade do impacto significativo na evolução da EM (Jacobs et al. 2000; Comi et al. 2001a; Kappos et al. 2006; Comi et al. 2009).

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivos gerais

A EM é uma patologia multifactorial autoimune caracterizada por inflamação crónica, desmielinização e degeneração axonal do SNC, sendo a maior causa de incapacidade em adultos jovens. A elevada heterogeneidade clínica, o curso da doença e mecanismos fisiopatológicos tornam não só o diagnóstico como o prognóstico da EM extremamente desafiadores.

No sentido de contribuir para um melhor esclarecimento desta doença o principal objetivo deste estudo foi a tentativa de encontrar marcadores biológicos que pudessem funcionar como indicadores de prognóstico na esclerose múltipla. Assim, foi investigada a presença de BOC do tipo IgG e IgM e de marcadores de disfunção da BHE (MMPs, TIMPs e CAMs) em doentes de EM, usando como controlos doentes com outras patologias inflamatórias e não inflamatórias do SNC, que habitualmente fazem diagnóstico diferencial com EM. Foi ainda objetivo deste trabalho perceber se a presença do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 conferia suscetibilidade para a EM (por comparação com um grupo de controlos saudáveis) e influenciava o curso clínico da doença.

Ao longo do trabalho tiveram-se em conta os vários subtipos clínicos da EM, o grau de incapacidade e a diversidade nas manifestações clínicas ao longo do curso da doença, bem como as diferentes abordagens terapêuticas a que os doentes foram sujeitos.

### 1.4.2 Objetivos específicos

Para melhor alcançar o objetivo geral deste trabalho a presente investigação foi dividida em três estudos que se complementam, e que têm os seguintes objetivos específicos:

#### **1.º Pesquisa de bandas oligoclonais de imunoglobulinas G e M:**

- a) Comparar a presença de BOC IgG e IgM entre doentes de EM e doentes com outras doenças inflamatórias e não inflamatórias do SNC.
- b) Avaliar se a presença de BOC IgG e IgM, no LCR, condiciona as características de apresentação da doença em doentes de esclerose múltipla.

c) Investigar se a presença de BOC IgG e IgM influencia a evolução da EM ao longo do tempo, tendo em conta o número de surtos, o grau de incapacidade, conversão do subtipo clínico EMSR para EMSP e tipo de terapêutica administrada aos doentes de EM.

**2 ó Marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica:**

a) Comparar os níveis séricos e no LCR de uma série de marcadores de disfunção da BHE - metaloproteinases, seus respetivos inibidores (MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2) e moléculas de adesão (sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Selelina) - entre doentes de EM e doentes com outras doenças inflamatórias e não inflamatórias do SNC.

b) Avaliar se os níveis destes marcadores de disfunção da BHE, bem como as razões MMPs/TIMPs e as razões LCR/soro (quantificadas no momento do diagnóstico) têm potencial preditivo do curso clínico da EM, avaliado através do grau de incapacidade manifestada pelo doente, conversão de EMSR para EMSP e tipo de terapêutica administrada.

**3 ó Estudo do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9:**

a) Analisar a distribuição do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 numa população de doentes de EM e de indivíduos saudáveis.

b) Avaliar se a presença do polimorfismo -1562 C/T em indivíduos caucasianos portugueses confere suscetibilidade para desenvolver EM.

c) Relacionar a presença do polimorfismo com a concentração sérica da MMP-9, quer em doentes de EM quer em controlos saudáveis.

d) Investigar se a presença do polimorfismo está associada à progressão da doença, tendo em conta o grau de incapacidade, conversão de EMSR para EMSP e tipo de terapêutica administrada aos doentes de EM.



## **2 Material e métodos**

### **2.1 Seleção da população**

A presente investigação envolveu um total de 530 indivíduos distribuídos pelos grupos: EM, constituído por doentes de esclerose múltipla, com 265 indivíduos, sendo 187 do sexo feminino; DNI, formado por doentes com doenças não inflamatórias do SNC, com 39 indivíduos e destes 24 eram mulheres; DI, composto por doentes com outras doenças inflamatórias do SNC, com 40 indivíduos, sendo 30 do sexo feminino; CS, constituído por controlos saudáveis, com 186 indivíduos e destes 122 eram mulheres.

Os doentes de EM foram recrutados no serviço de Neurologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC n=235) e no Hospital de Braga (n=30), diagnosticados segundo os critérios de McDonald e Polman (McDonald et al. 2001; Polman et al. 2005; Polman et al. 2011). Todos os doentes com esclerose múltipla apresentavam no mínimo, dois anos de seguimento da doença.

O grupo DNI compreendeu um amplo conjunto de patologias não inflamatórias distribuídas do seguinte modo: hipertensão intracraniana (n=3), neuropatia ótica isquémica anterior (n=3), neoplasia do SNC (n=2), doença vascular cerebral (n=2), fibromialgia (n=2), epilepsia (n=2), cefaleia (n=2), nevralgia do trigémeo (n=2) entre outras (n=21), tais como miastenia gravis, mielopatia cervical, depressão, distúrbio de ansiedade, etc.

No grupo DI estavam associadas várias patologias, que não EM, como: mielite (n=11), nevrite ótica (n=6), doença de *Behçet* (n=4), vasculite (n=3), síndrome de *Guillain Barré* (n=3) e outras (n=13). Os grupos DNI e DI constituíram grupos controlo e foram igualmente recrutados no serviço de Neurologia do CHUC.

Toda a informação demográfica (idade e sexo) e clínica foi obtida por consulta na base de dados local ou registos médicos individuais. Para o estudo, nos doentes de EM, foram selecionados dados clínicos referentes à data da punção lombar como idade, número de anos da doença e valor de EDSS. Foi, ainda, recolhido um conjunto de informação relevante ao longo da evolução da doença que permitiu a presente investigação. Assim, registaram-se os primeiros sintomas (vias óticas, supratentorial, coluna vertebral, tronco

cerebral), os subtipos clínicos (EMSR, EMSP, EMPP), o número total de anos da EM, os diferentes valores de EDSS no decurso da doença (após o 1º ano, aos 3, 5 e 10 anos e, ainda, superior a 10 anos), bem como o EDSS atual, correspondente ao ano de 2014. Para os doentes com formas surto-remissão foi também analisado o número de surtos ao longo da doença (ao fim do 1ºano, aos 3 e 5 anos e superior a 5 anos) e a ocorrência ou não de conversão do fenótipo EMSR para EMSP. Registaram-se as terapêuticas instituídas para cada doente, agrupando-se as diferentes abordagens terapêuticas em: apenas terapia de 1ª linha, apenas de 2ª linha ou ambas.

## **2.2 Colheita e processamento das amostras**

As amostras de soro e LCR de doentes de EM, DNI e DI, utilizadas para a pesquisa de bandas oligoclonais e marcadores de disfunção da BHE (secção 3.1 e 3.2), faziam parte do arquivo de amostras biológicas do laboratório de Neuroquímica do CHUC. Estas amostras foram colhidas durante a investigação diagnóstica de rotina de doentes com uma suspeita clínica de doença desmielinizante, e foram posteriormente classificados nos três grupos de estudo. As amostras selecionadas para o presente estudo foram colhidas entre o ano de 2007 e o início de 2013.

Resumidamente, após a colheita, as amostras de LCR e sangue venoso (em tubo sem preparação) foram enviadas de imediato ao laboratório e centrifugadas a 1800 xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante do LCR e o soro resultantes foram então aliquotados em criotubos de polipropileno e conservados a -80°C, numa arca de ultracongelamento, *Sanyo Ultra Low (Sanyo Electric Co Ltd., Japão)* até ao seu processamento. O intervalo de tempo entre a colheita das amostras e o seu armazenamento não excedeu as 2 horas.

As amostras de sangue dos controlos saudáveis e dos doentes de EM para o estudo do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 (secção 3.3) foram colhidas especificamente para este trabalho durante os anos de 2013 e 2014, após aprovação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra e posterior ratificação da Comissão de Ética do CHUC. Todos os participantes foram voluntários tendo preenchido e assinado um formulário de consentimento informado, após uma correta explicação do projeto e de tomarem conhecimento dos procedimentos a realizar. Deste modo, comprometeram-se a cumprir o protocolo, salvaguardando-se a possibilidade de poderem, a qualquer momento, abandonar o estudo, se assim o desejassem. As amostras

patológicas usadas neste estudo provinham de doentes já com um diagnóstico clínico de EM, seguidos na consulta do CHUC e do Hospital de Braga.

Foram colhidos 10 ml de sangue venoso e distribuídos por dois tubos: um tubo sem preparação, para obtenção de soro e outro com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético tri-potássico (K<sub>3</sub>EDTA), para análise do sangue total.

Uma vez no laboratório, o tubo sem preparação, após retração do coágulo, foi centrifugado a 1800 xg, durante 10 minutos, a 4°C. De seguida, o soro foi aliquotado em criotubos, rotulado e conservado a -80°C na arca de ultracongelamento, para quantificação da MMP-9. O tubo com K<sub>3</sub>EDTA foi conservado a 4°C, para extração de ADN.

O ADN genómico foi extraído a partir de células mononucleares, leucócitos, presentes no sangue periférico, usando o kit *Spin Blood Mini Kit, Invisorb® da Stratec molecular, Berlin* e seguidas as orientações do fabricante. Resumidamente, a 200 µL de sangue total, adicionou-se um tampão lisante e com auxílio de agitação e temperatura (56°C) procedeu-se à lise da amostra. De seguida juntou-se proteinase K, homogeneizou-se e o lisado foi transferido para um mini filtro (*RTA Spin Filter*). Após centrifugação o ADN genómico ficou adsorvido à membrana do filtro. Para remover contaminantes e eliminar o etanol seguiu-se uma pré-lavagem e lavagem com solução tampão. Por fim, procedeu-se à eluição do ADN genómico com tampão eluição, sendo posteriormente conservado à temperatura de 4-8°C.

O processamento e conservação das amostras foram realizados no laboratório de Neuroquímica do CHUC.

Todo o estudo decorreu segundo os princípios da declaração de Helsínquia, 2013 (Assoc 2013), assegurando a máxima proteção e confidencialidade.

## **2.3 Pesquisa de imunoglobulinas (Ig) oligoclonais no soro e LCR**

A pesquisa de bandas oligoclonais (BOC) de Ig em amostras de LCR e soro realizou-se por focagem isoelétrica (FIE). Esta técnica permite a separação das Ig presentes no LCR e no soro, de acordo com o seu ponto isoelétrico, num gel com gradiente de pH. Após a

separação das Ig e da sua transferência para uma membrana, estas são visualizadas por um processo de imunoblotagem.



**Figura 2.1** ó Equipamento de focagem isoeletrica: tina para focagem, banho de arrefecimento termostaticado e fonte de alimentaçao. Laboratório de Neuroquímica do CHUC (*DESAGA Sarstedt-gruppe HF210, PS 3000, Alemanha*).

### 2.3.1 Bandas oligoclonais de IgG

Para a pesquisa de BOC de IgG no LCR e soro foi utilizado o kit comercial *IgG-IEF da Helena BioSciences Europe, versão Double Antibody*, baseado no método original descrito por Keir et al, 1990 (Keir et al. 1990).

Resumidamente, as amostras (5  $\mu$ L) de LCR (inteiro) e de soro (previamente diluído 300 vezes em soro fisiológico, de modo a igualar a concentração de IgG presente no LCR), foram aplicadas num gel de agarose, com um gradiente de pH 3-10. Embeberam-se as pontes do eletrodo nas respectivas soluções: ânodo (+), ácido acético 0,3 M e cátodo (-), hidróxido de sódio 1M e colocaram-se ao longo das extremidades do gel. Correu-se então a eletroforese a 700V, 10W, durante 45 minutos a 10°C, numa tina para focagem isoeletrica equipada com banho de arrefecimento termostaticado e fonte de alimentaçao com integrador Volt/hora da *DESAGA Sarstedt-gruppe HF210, PS 3000, Alemanha*, ver Figura 2.1. Durante este processo, as proteínas migram até à região cujo pH coincide com o seu ponto isoeletrico. As proteínas foram então transferidas passivamente, durante 30

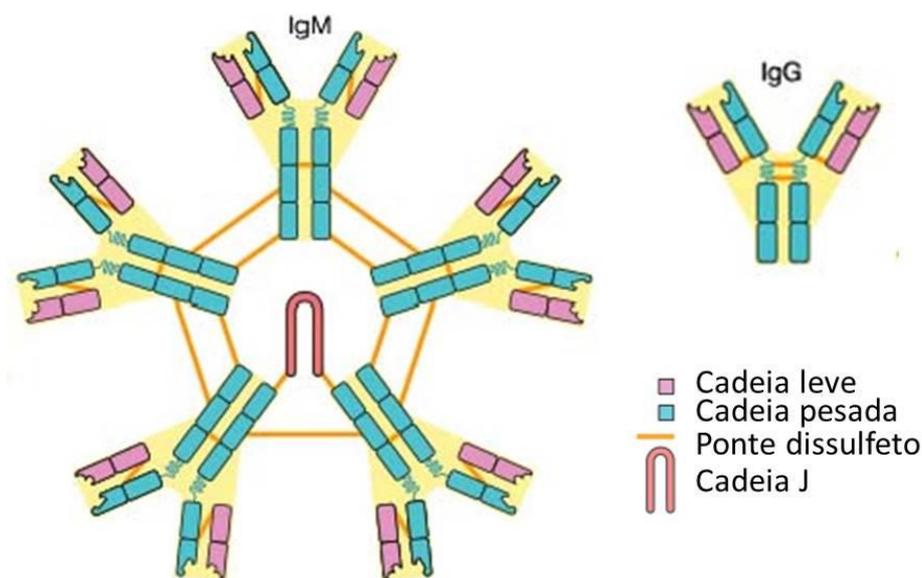
minutos, para uma membrana de nitrocelulose, previamente ativada em 10% de metanol. Após o bloqueio da membrana durante 30 minutos numa solução com 2% de leite magro, procedeu-se à incubação com o anticorpo primário (anticorpo anti-IgG de cabra anti-humano diluído 1:1000 em solução com 0,2% de leite magro), também durante 30 minutos. Após uma breve lavagem (5 minutos) com soro fisiológico (NaCl 0,9%), as membranas foram incubadas durante 30 minutos com o anticorpo secundário (anticorpo anti-IgG anti-cabra conjugado com peroxidase) diluído 1:1000 em solução com 0,2% de leite magro. Seguiu-se um novo passo de lavagem, procedendo-se então à revelação das membranas com cromogénio (3-amino-9-etil-carbazole, previamente diluído em tampão acetato 20 mM com 3% de peróxido de hidrogénio). Após cerca de 15-20 minutos de incubação, as membranas desenvolvem uma coloração vermelho-acastanhada, sendo possível a visualização de bandas oligoclonais sobrepostas a um padrão policlonal de IgG (Figura 1.7). Os resultados foram interpretados, qualitativamente, por comparação da presença ou ausência de bandas oligoclonais nas amostras emparelhadas de soro e LCR. A interpretação dos resultados foi sempre efetuada por dois observadores independentes, de forma a reduzir e eliminar possíveis erros e, em caso de dúvida, o par de amostras soro e LCR foi repetido. Os resultados têm por base os cinco tipos de padrões previamente publicados no relatório de consenso por Andersson e colaboradores (Andersson et al. 1994), previamente descritos na Figura 1.7.

### **2.3.2 Bandas oligoclonais de IgM**

Para a pesquisa de BOC de IgM no LCR e soro foi utilizado um protocolo manual adaptado do método descrito por Villar et al., 2001, (Villar et al. 2001). Este método é em geral semelhante ao usado para deteção das BOC de IgG, mas apresenta algumas diferenças, nomeadamente a necessidade prévia de redução da amostra, devido ao elevado peso molecular da molécula de IgM pentamérica (Figura 2.2).

Tratando-se de um método manual, foi necessário fazer previamente os géis com gradiente de pH. Para tal, dissolveram-se, por fervura, 0,3 g de agarose para focagem isoeléctrica (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Suécia, 17-0468-01) e 3,6 g de sorbitol (*Sigma*®) em 25 mL de água destilada com 2,5 mL de glicerol (*Sigma*®). Transferiu-se então a solução para um banho a 65°C e, após estabilização da temperatura, adicionaram-se gota a gota, com agitação constante, 2,5 mL de anfolinas com pH 5-8 (*Pharmalyte<sup>TM</sup> 5-8*) da *GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Suécia. Seguidamente verteu-se rapidamente o

gel sobre o respetivo suporte (225 x 110 x 1,5 mm) nivelado, espalhando-o rapidamente por toda a superfície da película de *Gelbond* (com a face hidrofílica voltada para cima). Deixou-se solidificar durante alguns minutos e guardou-se o gel em câmara de humidade fechada a 4°C durante o mínimo de 1 dia e o máximo de 1 semana.



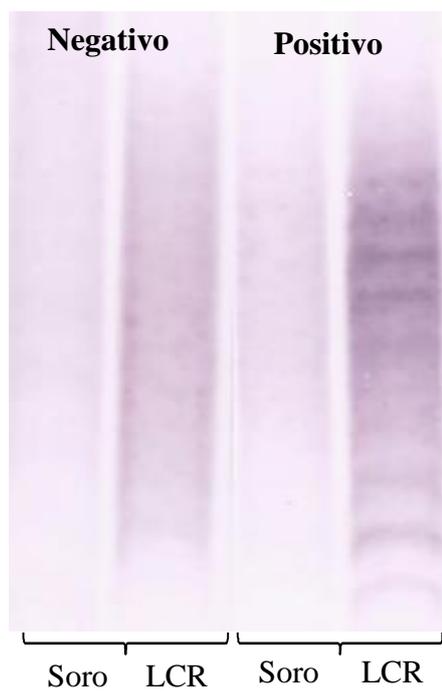
**Figura 2.2** ó Imunoglobulinas do tipo IgM (pentâmero) e IgG (monómero). Adaptada de (Enciclopédia Britânica, Inc. 1999).

Para a redução da IgM nas amostras adicionou-se a 20  $\mu$ L de amostra (LCR inteiro ou soro previamente diluído 300 vezes), 2,5  $\mu$ L de Tris base 1M, pH 9,7 e 2,5  $\mu$ L de ditiotretitol 0,5M (*Sigma*®), seguida de incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente (TA).

Os pares de amostras (10  $\mu$ L) de soro e LCR reduzidas foram aplicados no gel de agarose, com um gradiente de pH 5-8, previamente equilibrado à TA.

Embeberam-se as pontes do elétrodo nas respetivas soluções: ânodo (+), ácido sulfúrico 0,05M e cátodo (-), hidróxido de sódio 1M e correu-se a eletroforese a 1250V, 150mA, 5W, a 10°C, até atingir 450V/h. Aumentou-se então a potência para 10W e continuou-se a corrida, até atingir os 1500 V/h, aproximadamente ao fim de 130 min. As proteínas foram então transferidas passivamente, durante 15 minutos, a 10°C, para uma membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) da *GE Healthcare, Amersham Hybond*™, Suécia, previamente ativada em 10% de metanol e lavada três vezes com água destilada. Após o bloqueio da membrana durante 30 minutos numa solução com 2% de leite magro

em soro fisiológico (NaCl 0,9%), procedeu-se à incubação com o anticorpo (anticorpo anti-IgM de cabra anti-humano conjugado com fosfatase alcalina, *Sigma*®), diluído 1:1500 em solução com 0,2% de leite magro em soro fisiológico), *overnight*, a 4°C, com agitação. Terminada a incubação, iniciou-se a lavagem abundante com água destilada, procedendo-se então à revelação das membranas com cromogénio (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato disódico-BCIP 0,04 M, (*Sigma*®) e *nitro blue tetrazolium*-NBT 0,036M, *Sigma*®, previamente diluídos em tampão Tris-base 1 M a pH 9,7 a 10%). Após cerca de 30-45 minutos de incubação, as membranas desenvolveram uma coloração que permitiu a visualização de bandas oligoclonais sobrepostas num padrão de IgM policlonal (Figura 2.3). Os resultados foram interpretados, qualitativamente, por comparação da presença ou ausência de bandas oligoclonais nas amostras emparelhadas de soro e LCR. A interpretação dos resultados foi sempre efetuada por dois observadores independentes, de forma a reduzir e eliminar possíveis erros e, na dúvida, o par de amostras soro e LCR foi repetido. No caso das BOC IgM, de acordo com Villar et al 2001, os resultados são reportados apenas como negativos (inclui a ausência de bandas no LCR e soro ou a presença das mesmas bandas no LCR e soro) ou positivos (inclui a presença de bandas apenas no LCR ou a presença de bandas no LCR e soro, mas, com bandas adicionais no LCR).

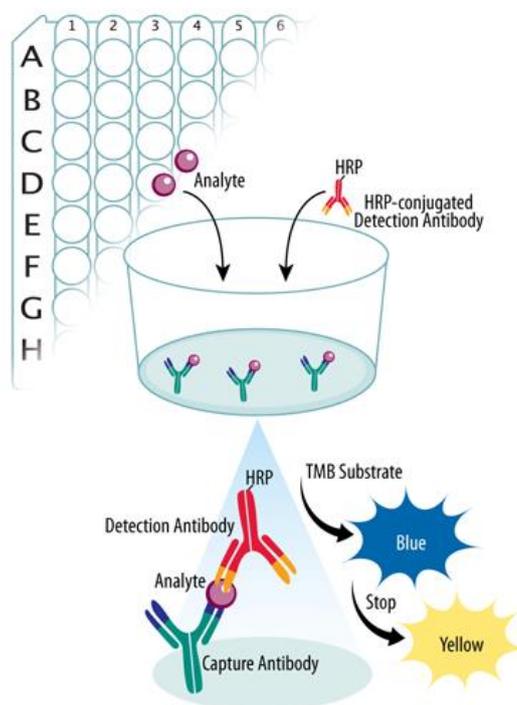


**Figura 2.3 6** Imagem digitalizada de bandas oligoclonais IgM, obtidas por focagem isoelétrica e imunoblotagem, nos pares de amostras soro e LCR. Laboratório de Neuroquímica do CHUC.

## 2.4 Marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica

Como marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica determinou-se a concentração de moléculas de adesão na sua forma solúvel (sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Selelina), metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e respetivos inibidores tecidulares (TIMP-2 e TIMP-1), em amostras de soro e LCR. A metodologia utilizada para a determinação destes marcadores foi semelhante, usando ensaios imunoenzimáticos, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA*, em microplaca de origem comercial (*Quantikine® ELISA da R&D Systems, Europe, Ltd. UK*), e o protocolo realizado segundo as indicações do fabricante.

Assim, a informação abaixo descrita deve ser entendida como transversal aos vários marcadores de disfunção da BHE, estando os seus protocolos compilados na Tabela 2.1, onde se encontram as particularidades de cada ensaio. A Figura 2.4 representa um esquema geral das etapas efetuadas nos ensaios imunoenzimáticos em cada um dos protocolos realizados.



**Figura 2.4** É Esquema geral do procedimento imunoenzimático em microplaca aplicado nos protocolos ELISA. Figura gentilmente cedida por *R&D Systems, Inc.*

De modo resumido, para cada uma das moléculas avaliadas, os poços da microplaca estavam revestidos com o anticorpo de rato monoclonal específico contra a molécula em estudo, com exceção do ensaio para a MMP-2, que utiliza um anticorpo policlonal. A partir do padrão, incluído no kit, prepararam-se diluições sucessivas de modo a produzir uma curva padrão para cada uma das moléculas em estudo. As amostras de soro, previamente diluídas, de LCR (diluídas ou inteiras, segundo descrito na Tabela 2.1), os padrões e o branco foram então pipetados na microplaca em duplicado. De seguida aplicou-se um segundo anticorpo marcado com a enzima peroxidase (conjugado), específico para cada uma das moléculas avaliadas, mas que liga a um epítipo diferente do antigénio em relação ao anticorpo imobilizado na placa. Deste modo, o antigénio presente na amostra fica capturado na fase sólida, entre o anticorpo adsorvido à placa e o conjugado. Após incubação à temperatura ambiente procedeu-se à lavagem, no lavador automático (*Plate Washer, das, Roma, Itália*) para remoção das substâncias não ligadas. Adicionou-se então o substrato da peroxidase (mistura em partes iguais de peróxido de hidrogénio e cromogénio-tetrametilbenzidina) e após incubação à temperatura ambiente ocorreu o desenvolvimento de cor diretamente proporcional à quantidade de antigénio ligado. A reação foi então terminada pela adição de uma solução stop (ácido sulfúrico 2N) e a intensidade de cor foi medida espectrofotometricamente, de imediato após a adição da solução stop, a 450 nm, com correção a 540 nm no leitor de microplacas *Labsystems Multiskan Ascent 354 da Scientific, San Diego, California*.

De seguida foi calculada a média das densidades óticas (D.O.) dos duplicados de cada amostra/padrão/branco, subtraída a média da D.O. do branco e calculado o respetivo coeficiente de variação (CV). Este resulta da razão entre o desvio padrão (DP) e a média da amostra. Sempre que o CV foi superior a 20% ( $\% CV = DP/média \times 100$ ), o resultado foi rejeitado e a amostra analisada de novo. A partir das D.O. dos padrões foi, por placa e para cada ensaio, construída uma curva padrão. Como exemplo (Figura 2.5). O critério de aceitação para os pontos da curva de calibração foi semelhante ao utilizado para as amostras. O número mínimo de pontos para efetuar a curva de calibração foi de 6 pontos, variando entre 7 e 9, para os vários protocolos.

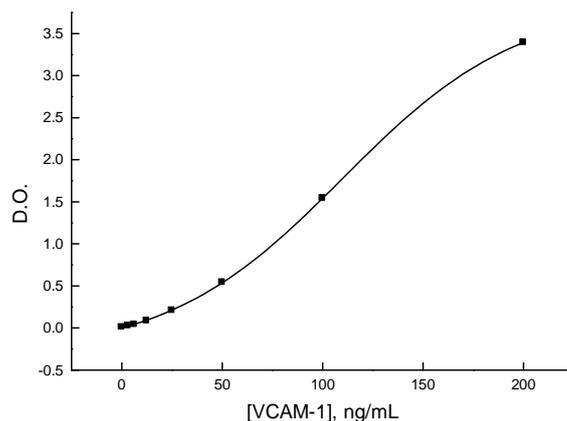
De seguida as concentrações de cada marcador (expressos em ng/mL) das amostras de LCR e soro foram obtidas por extrapolação da curva padrão. Para amostras com valores acima dos limites da curva padrão repetiu-se o ensaio com diluição. Os resultados das amostras sujeitas a diluição, foram então multiplicados pelo fator de diluição.

**Tabela 2.1** ó Resumo dos protocolos dos marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica

<b>Técnicas ELISA</b>							
	<b>sICAM-1</b>	<b>sVCAM-1</b>	<b>sE-Selelina</b>	<b>MMP-2</b>	<b>MMP-9</b>	<b>TIMP-2</b>	<b>TIMP-1</b>
<b>Amostra/ diluição</b>	LCR-int Soro-1/20	LCR-int Soro-1/20	LCR-int Soro-1/20	LCR-1/2 Soro-1/10	LCR-int Soro-1/100	LCR-1/10 Soro-1/50	LCR-1/10 Soro-1/100
<b>Volume amostra/ padrão</b>	100µL	100µL	100µL	50µL	100µL	50µL	50µL
<b>Lavagem</b>	---	---	4x	4x	4x	4x	3x
<b>Conjugado</b>	100µL	100µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL
<b>Incubação</b>	1.30H; TA em agitação	1.30H; TA	2H; TA	2H; TA em agitação	1H; TA em agitação	2H; TA em agitação	1H; TA em agitação
<b>Lavagem</b>	4x	4x	4x	4x	4x	4x	3x
<b>Substrato</b>	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL	200µL
<b>Incubação</b>	30min; TA	20min; TA	30min; TA	30min; TA	30min; TA	30min; TA	30min; TA
<b>Solução stop</b>	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
<b>Leitura</b>	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm	450nm/ 540 nm
<b>DMD média</b>	0,096 ng/mL	0,6 ng/mL	0,009 ng/mL	0,047 ng/mL	0,156 ng/mL	0,011 ng/mL	<0,08 ng/mL
<b>Valores da curva padrão</b>	50;25;12.5;6 .25;3.13;1.5 6;0.78 ng/mL	200;100;50; 25;12.5;6.25 ;3.125 ng/mL	4;2;1;0.5; 0.25;0.125; 0.063;0.032; ng/mL	50;25;12.5;6 .25;3.13;1.5 6;0.78;0.39 ng/mL	20;10;5;2.5; 1.25;0.625;0 .312;0.156 ng/mL	10;5;2.5;1.2 5;0.625;0.31 2;0.156 ng/mL	10;5;2.5;1.2 5;0.625;0.31 3;0.156 ng/mL

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Selelina- *soluble E-Selectin*; MMP-2: metaloproteinase da matriz-2; MMP-9: metaloproteinase da matriz-9; TIMP-2: inibidor tecidual da metaloproteinase-2; TIMP-1: inibidor tecidual da metaloproteinase-9; DMD: dose mínima detetável; LCR: líquido cefalorraquídeo; TA: temperatura ambiente; int: inteiro.

Calculada a concentração de cada um dos marcadores de disfunção da BHE em estudo no soro e LCR, foi ainda estimada a razão entre as MMPs e os respetivos TIMPs (MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1), bem como, a razão entre os níveis presentes no LCR e no soro, seguida da multiplicação por um fator de 1000 [(LCR/soro) x 1000].



**Figura 2.5** é Exemplo de uma das curvas padrão efetuada num dos ensaios ELISA, sVCAM-1. Laboratório de Neuroquímica do CHUC.

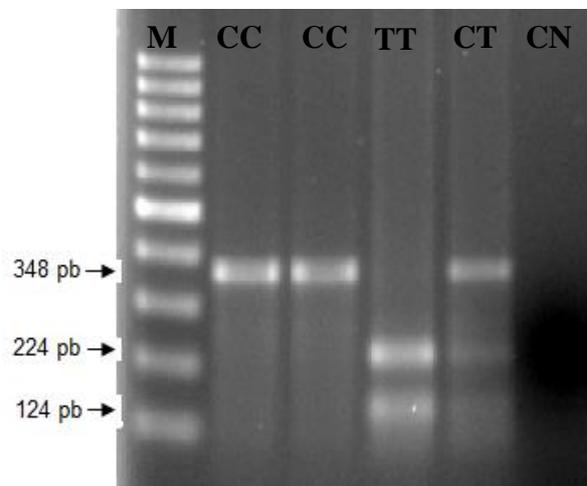
## 2.5 Genotipagem do polimorfismo do gene da MMP-9

O trabalho laboratorial para o estudo do polimorfismo foi realizado no laboratório de biologia molecular, do Centro do Sangue e Transplantação de Coimbra do Instituto Português do Sangue e Transplantação de Coimbra. No laboratório de Neuroquímica apenas foi efetuada a extração de ADN genómico.

Ao ADN genómico foi aplicada metodologia PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), para pesquisa do polimorfismo na posição -1562 C/T do gene da MMP-9, localizado na região promotora e depositado na base de dados NCBI como rs3918242.

A PCR para amplificação do fragmento de 348 pb foi realizada numa mistura de 25  $\mu$ L contendo 50 ng de ADN; 10 pmol de cada primer: 5'-ATGGCTCATGCCCGTAATCC-3' (*forward*); 5'-GGGCAGGGTCTATATTCACC-3' (*reverse*), da *Applied Biosystems, UK*; 0,2 mM de cada dNTP (*Thermo Scientific, USA*); 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5,0 U *Taq DNA polymerase* (*Promega, Madison, USA*) e, 2,5  $\mu$ L de tampão 10x. Preparada a mistura programou-se e colocou-se no termociclador (*Thermocycler DNA engine®*, *Thermal Cycler, Bio-Rad, Germany*), após uma desnaturação inicial a 96°C durante 5 min, a amostra foi sujeita a 30 ciclos de amplificação, consistindo cada ciclo numa desnaturação a 96°C durante 45s, *annealing* a 59,7°C durante 45s e extensão a 72°C durante 45s, seguindo-se a extensão final por 10 min, terminando com uma refrigeração até 15°C. Após eletroforese (tina de eletroforese e fonte de alimentação, *Bio-Rad, Germany*), a 10  $\mu$ L do produto amplificado foi adicionado 0,5  $\mu$ L de enzima de restrição SphI (*Thermo*

*Scientific, USA*), e incubado *overnight* a 37°C. Terminada a digestão correu-se uma eletroforese em gel de agarose a 2 % com o produto da digestão. Por fim procedeu-se à visualização do gel no equipamento de aquisição de imagem *Gel Doc™ XR*, (*BioRad, Hercules, USA*), com o *software ImageLab®* versão 3.0 (*Bio-Rad Hercules, USA*), observando-se fragmentos não digeridos com 348 pb (alelo C) e fragmentos digeridos mostrando produtos da digestão com 224 e 124 pb (alelo T), ver Figura 2.6. Importa salientar que a interpretação da digestão foi sempre efetuada por dois observadores independentes, de forma a reduzir e eliminar possíveis erros e, em caso de dúvida, a digestão foi repetida.



**Figura 2.6** Eletroforese de fragmentos de ADN, após digestão com a enzima SphI. M: marcador molecular de 1000pb; CC: homocigótico normal; TT: homocigótico mutado; CT: heterocigótico; CN: controlo negativo; pb: pares de bases.

## 2.6 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o programa *SPSS® Statistics* versão 22 da *IBM®* e os gráficos efetuados através do programa *GraphPad Prism* versão 7.

Testada a normalidade da amostra, seguiu-se a análise descritiva das variáveis com cálculos de média, mínimo e máximo, erro padrão e desvio padrão (DP). Para o estudo comparativo de variáveis qualitativas foram usados os testes de  $\chi^2$  de *Pearson*, Correção de Continuidade de Yates e Exato de Fisher. Para a correta aplicação do teste de  $\chi^2$  de *Pearson* tivemos que cumprir os seguintes pressupostos: total da amostra > 30 casos,

todas as classes com frequências esperadas  $>1$  e que pelo menos 80% das frequências esperadas fossem  $\geq 5$ . Foram também aplicados testes que avaliavam risco: Razão dos Produtos Cruzados (*Odds Ratio*) bem como os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Na análise para variáveis quantitativas foi aplicado o teste paramétrico *t-Student* ou o seu equivalente não paramétrico *U de Mann-Whitney*, comparando 2 grupos. Na presença de 3 ou mais grupos foi testada a ANOVA duas vias ou o equivalente não paramétrico o teste *Kruskal-Wallis*, seguido da comparação múltipla de Dunn-Bonferroni.

Para a tomada de decisão na escolha de testes da família paramétrica ou não paramétrica tivemos que recorrer às medidas de forma: medidas de assimetria (coeficiente de Skewness), de achatamento (coeficiente de Curtose) e Distribuição Normal (*Kolmogorov-Smirnov* ou *Shapiro-Wilk*).

A análise de sobrevida foi usada para avaliar a probabilidade de atingir um valor de EDSS  $\times 3$ , definido como indicador de deficiência moderada (Leray et al. 2010; Kerbrat et al. 2015), ou um *score* de EDSS  $\times 4$ , caracterizado como a capacidade de caminhar 500 m sem ajudas ou descanso (Confavreux et al. 2000; Becker et al. 2015). As curvas de *Kaplan-Meier* nas distribuições de sobrevivência foram comparadas pelo teste de log-rank. O tempo de sobrevivência foi calculado como o intervalo entre a avaliação da linha de base inicial para o tempo para atingir uma pontuação de EDSS 3 ou EDSS 4. Para os doentes que não atingiram o valor de 3,0 ou de 4,0, o tempo de sobrevida foi censurado na data da última avaliação clínica.

O modelo de regressão logística binária foi usado para avaliar a contribuição dos diferentes marcadores laboratoriais como preditores do curso clínico da EM e também para avaliar a contribuição das variáveis clínicas como preditores nos portadores do polimorfismo -1562 C/T.

A correlação de *Pearson* permitiu correlacionar positiva ou negativamente a relação entre duas variáveis. Para a leitura dos valores de correlação de Pearson considerou-se que valores de  $r >0$  significa que um aumento de magnitude de uma das variáveis estará associado um aumento linear da outra variável. Porém, para  $r <0$  assumiu-se que o aumento de valor de uma das variáveis terá associada uma redução linear do valor da outra variável. Para  $r=0$  considerou-se a não existência de associação linear entre as duas variáveis, isto é, variações em magnitude de uma variável não estão associadas a variações lineares da magnitude da outra variável. Em função do sinal e do valor absoluto

deste coeficiente pode concluir-se sobre a direção e a intensidade da relação existente entre duas variáveis (Maroco 2005).

Na análise do polimorfismo, o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foi avaliado usando o teste de equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para o cálculo de 2 alelos (Emerson 2010).

Os resultados foram apresentados na forma de (média±desvio padrão), exceto quando indicada a (média±erro padrão) e considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .



## **3 Resultados**

### **3.1 Bandas oligoclonais no soro e líquido cefalorraquídeo**

#### **3.1.1 Caracterização da amostra**

A pesquisa de bandas oligoclonais IgG foi realizada num total de 259 amostras distribuídas pelos seguintes grupos: 183 doentes de EM, 37 doentes com doença não inflamatória do SNC (DNI), e 39 doentes com outras doenças inflamatórias do SNC (DI). As características demográficas destes grupos encontram-se descritas na Tabela 3.1. À data da punção lombar, o grupo de doentes de EM apresentou uma idade média de 37 anos, (mínimo de 15 e máximo de 65 anos), sendo esta significativamente mais baixa do que a idade média dos doentes do grupo com DI ( $p=0,005$ ) e com DNI ( $p=0,028$ ). Registou-se um predomínio de doentes do sexo feminino no grupo de EM (70,0%; relação mulher/homem de 2,33), que também se verificou nos outros dois grupos em estudo (DNI 62,0% e DI 74,0%). Do ponto de vista clínico o grupo EM apresentou uma duração média da doença na data da PL de 4,25 anos, sendo de salientar que esta era muito variável. Analisada a distribuição da duração média da doença na data da PL dos doentes de EM, verificou-se que esta era inferior a 5 anos em 75% dos casos e era superior a 10 anos em apenas 13% dos casos. Em relação aos primeiros sintomas manifestados pelos doentes de EM, estes registaram-se ao nível do tronco cerebral em 34,7% dos casos, da coluna vertebral em 33,1%, supratentorial em 24,4%, das vias óticas em 23,2%, sendo que 15,6% apresentaram sintomas iniciais em mais do que uma via. O curso clínico da doença foi, em 80% dos casos, de surto-remissão, cerca de 10% dos doentes desenvolveram formas secundárias progressivas, e os restantes 10% formas primárias progressivas. Quanto ao grau de incapacidade atual dos doentes de EM, este atingiu na escala de EDSS, um valor médio de  $3,11 \pm 1,93$ , com um mínimo de 1,0 e um máximo de 8,0.

A pesquisa de bandas oligoclonais do tipo IgM foi feita num subgrupo destes doentes: 115 doentes de EM, 37 doentes com doença não inflamatória do SNC (DNI), e 32 doentes com outras doenças inflamatórias do SNC (DI), com características demográficas e clínicas semelhantes às apresentadas na Tabela 3.1. O grupo EM apresentava igualmente um predomínio do sexo feminino (71,3%) e uma idade média na PL de  $36,98 \pm 11,09$  anos,

(mínimo de 16 e máximo de 65 anos), inferior à dos grupos de doentes DNI (44,22±13,94; p=0,016) e DI (47,41±15,63; p=0,003). Quanto à duração média da doença na data da PL esta foi de 4,20±0,65 anos nos doentes de EM, que apresentaram um curso da doença surto-remissão em 76,5% dos casos.

**Tabela 3.1** ó Caracterização demográfica e clínica dos grupos EM, DNI e DI

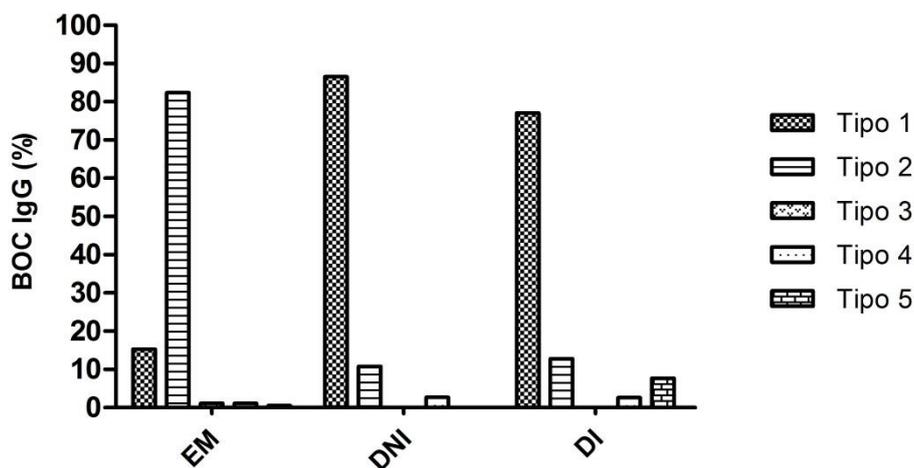
	<b>EM</b> <b>n=183</b>	<b>DNI</b> <b>n=37</b>	<b>DI</b> <b>n=39</b>
<b>Idade na PL; anos <sup>a</sup></b>	37,70±11,33	44,22±13,94*	46,0±14,83**
<b>(min-máx)</b>	(15-65)	(15-77)	(17-71)
<b>Sexo (F/M) <sup>b</sup></b>	128/55	23/14	29/10
<b>(F/M) %</b>	(69,9/30,1)	(62,2/37,8)	(74,4/25,6)
<b>Duração da EM até à PL; anos (min-máx)</b>	4,25±6,94 (0-35)	----	----
<b>Duração da EM total; anos (min-máx)</b>	11,68±7,35 (2-46)	----	----
<b>Subtipos</b>	147 EMSR; 18 EMSP; 18 EMPP	----	----
<b>EDSS atual (min-máx)</b>	3,11±1,93 (1,0 ó 8,0)	----	----
<b>PS vias óticas %</b>	23,2	----	----
<b>PS supratentorial %</b>	24,4	----	----
<b>PS coluna vertebral %</b>	31,3	----	----
<b>PS tronco cerebral %</b>	34,7	----	----

EM- esclerose múltipla; DNI- doença não inflamatória; DI- doença inflamatória; PL- punção lombar; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; PS- primeiros sintomas. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram <sup>a</sup>ANOVA e <sup>b</sup> <sup>2</sup> de Pearson. \*p <0,05; \*\*p <0,01 vs EM.

### 3.1.2 Padrão de bandas oligoclonais IgG e IgM

O resultado da pesquisa de bandas oligoclonais do tipo IgG por FIE, de acordo com os padrões publicados por Andersson e colaboradores, encontram-se representados na Figura 3.1. Como seria de esperar, registaram-se diferenças estatisticamente significativas

na distribuição dos diferentes padrões de IgG entre os grupos ( $p < 0,001$ ). Observou-se uma predominância do tipo 2, correspondendo à presença de BOC restritas ao LCR, no grupo EM ó 82,4%, comparativamente a 10,8% no grupo DNI e 12,8% no grupo DI. O grupo de doentes de EM foi também o único onde se registaram, em 2 casos, resultados do tipo 3 ó -Maior nº de BOC IgG no LCR que no soro. Já o perfil tipo 1 ó -Ausência de BOC IgG no soro e LCR foi o predominante dos grupos DNI (86,5%) e DI (77,0%), observando-se em apenas 15,3% dos doentes de EM. Relativamente ao tipo 4, designado por òEspelhoö onde o número de BOC é idêntico no LCR e no soro, este foi observado em apenas 2 doentes de EM (1,1%) e em um doente de cada um dos outros dois grupos (DNI e DI). O tipo 5, caracterizado pela presença de um padrão monoclonal IgG no LCR e no soro, foi observado em apenas um doente de EM (0,5%) e em 3 do grupo de DI (7,7%).



**Figura 3.1** ó Padrão de BOC IgG distribuído pelos grupos EM, DNI e DI. EM- esclerose múltipla; DNI- doença não inflamatória; DI- doença inflamatória; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; LCR- líquido cefalorraquídeo. O teste estatístico utilizado foi <sup>2</sup> de Pearson. **Tipo 1**- Ausência de BOC IgG no LCR e no soro. **Tipo 2**- Presença de BOC IgG restritas ao LCR. **Tipo 3**- òMaior nº de BOC IgG no LCR que no soro. **Tipo 4**- òEspelhoö igual nº de BOC IgG no LCR e soro. **Tipo 5**- Presença de um padrão monoclonal IgG no LCR e no soro.

De modo a facilitar a análise dos resultados, os diferentes padrões de BOC IgG foram reagrupados em apenas dois tipos - BOC IgG positivas (que inclui BOC IgG restritas ao LCR e maior número de BOC IgG no LCR que no soro) e negativas (que inclui a ausência de BOC IgG, BOC IgG idênticas no LCR e no soro e padrão monoclonal IgG no LCR e no soro), que se encontram apresentados na Tabela 3.2.

A positividade das BOC IgG no LCR foi de 83,5% no grupo de EM e de 15,8% no conjunto dos controlos (10,8% e 20,5% nos grupos DNI e DI, respetivamente). As BOC IgG positivas apresentaram assim uma associação estatisticamente significativa com a EM ( $p < 0,001$ ) e quando analisado o risco estimado, verificou-se um  $OR=27,20$ , com um intervalo de confiança a 95% de 13,10-56,46.

**Tabela 3.2** ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG e IgM positivas por grupo.

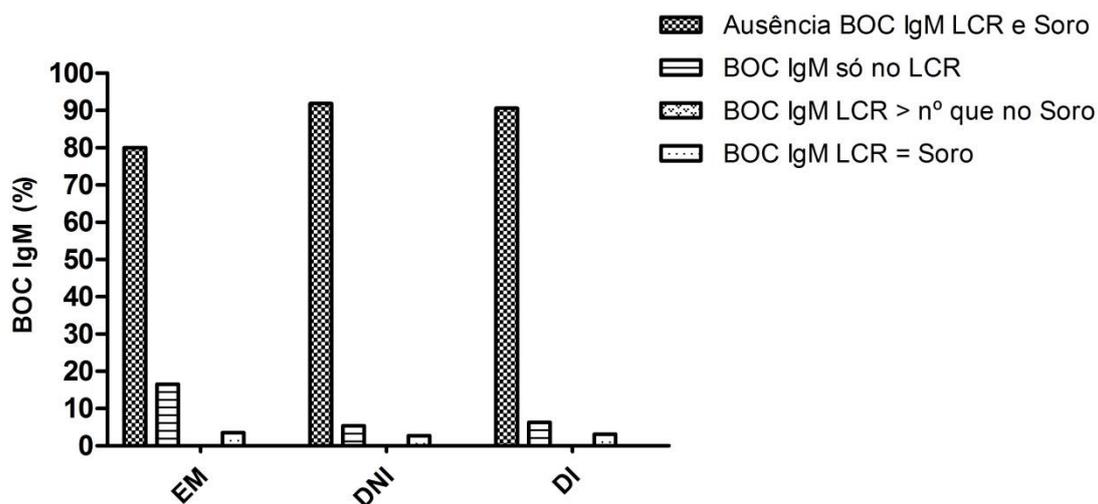
	EM	DNI	DI	Valor de $p$
<b>BOC IgG</b>				
(positivas/total)	152/183	4/37	8/39	$p < 0,001$
%	83,5%	10,8%	20,5%	
<b>BOC IgM</b>				
(positivas/total)	19/115	2/37	2/32	$p > 0,05$
%	16,5%	5,4%	6,3%	

EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM. O teste estatístico utilizado foi <sup>2</sup> de Pearson.

Avaliação similar referente à pesquisa de BOC do tipo IgM por FIE e segundo os padrões descritos por Villar e colaboradores é apresentada na Figura 3.2. Não se registaram diferenças estatisticamente significativas na distribuição dos diferentes padrões de IgM entre os grupos ( $p=0,300$ ). O padrão mais frequente nos 3 grupos de diagnóstico foi o de ausência de BOC IgM no LCR e soro, estando presente em 80,0% dos doentes de EM, 91,9% dos doentes DNI e 90,6% dos doentes DI. O padrão de BOC IgM restritas ao LCR foi observado em 19 (16,5%) dos doentes de EM e em apenas 2 doentes de cada um dos outros grupos (DNI ó 5,4%; DI ó 6,3%). No padrão de BOC IgM no LCR e no soro com o maior número no LCR, não se registou qualquer amostra no grupo EM nem nos controlos. Por fim, uma percentagem idêntica de doentes dos três grupos apresentou o padrão de espelho onde o número de BOC IgM é idêntico no LCR e no soro (EM ó 3,5%; DNI ó 2,7%; DI ó 3,1%).

Reagrupando os resultados em apenas 2 grupos (BOC IgM positivas e negativas), verifica-se que apenas 16,5% dos doentes de EM apresentaram BOC IgM positivas, enquanto nos grupos controlo de doentes com DNI e DI esta percentagem foi de apenas 5,4% e 6,3%, respetivamente, sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ),

conforme Tabela 3.2. Analisando simultaneamente a presença de BOC IgG e IgM, verificou-se que dos 19 doentes de EM com BOC IgM positivas, 16 (84,2%) eram também positivos para BOC IgG, enquanto 3 (15,8%) eram negativos. Relativamente ao controlo no grupo DNI constatou-se que os 2 doentes com BOC IgM positivas eram também BOC IgG positivas. Já no grupo DI das 2 amostras IgM positivas, apenas 1 (50%) era igualmente BOC IgG positiva.



**Figura 3.2** ó Padrão de BOC IgM distribuído pelos grupos EM, DNI e DI. EM- esclerose múltipla; DNI- doença não inflamatória; DI- doença inflamatória; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; LCR- líquido cefalorraquídeo. O teste estatístico utilizado foi  $\chi^2$  de Pearson.

### 3.1.3 Relação das bandas oligoclonais com a apresentação da doença

No grupo de doentes de EM, investigou-se então a possível influência da presença de BOC IgG e IgM no LCR nas características iniciais da doença.

Na Tabela 3.3 encontram-se as principais características demográficas e clínicas, na altura da PL, dos doentes de EM com BOC IgG positivas e negativas. Não se observaram diferenças relativamente ao sexo entre doentes com e sem bandas IgG, com aproximadamente 70% de mulheres em ambos os grupos. Contudo, verificou-se que os doentes com BOC IgG positivas apresentavam, na data da PL, uma idade média significativamente mais baixa do que os doentes sem bandas ( $36,78 \pm 11,06$  versus  $42,40 \pm 11,67$ ;  $p=0,013$ ), bem como uma duração da doença inferior ( $p=0,001$ ). Também se observaram diferenças quanto aos primeiros sintomas, com os doentes com BOC IgG positivas a apresentarem mais frequentemente manifestações clínicas a nível da via

supratentorial do que os doentes sem bandas IgG ( $p=0,02$ ). Acresce que 16,1% dos doentes com BOC IgG positivas manifestaram mais que um primeiro sintoma, sendo esta percentagem de 15,8% nos doentes com IgG negativas. Relativamente ao grau de incapacidade, os doentes de EM com BOC IgG negativas apresentaram um valor médio de EDSS na PL ligeiramente superior ao valor médio do EDSS no grupo com BOC IgG positivas, mas sem significado estatístico ( $p=0,81$ ).

**Tabela 3.3** ó Características demográficas e clínicas iniciais dos doentes de EM com e sem BOC IgG

	<b>BOC IgG Positivas n=152</b>	<b>BOC IgG Negativas n=31</b>
<b>Idade na PL; anos <sup>a</sup></b>	36,78±11,06*	42,40±11,67
<b>(min-máx)</b>	(15-64)	(20-65)
<b>Sexo (F/M) <sup>b</sup></b>	107/45	21/10
<b>Duração da EM até à PL; <sup>a</sup></b>	3,51±5,79**	8,15±10,61
<b>anos (min-máx)</b>	(0-35)	(0-34)
<b>EDSS na PL <sup>a</sup></b>	2,46±1,20	3,0±2,33
<b>(min-máx)</b>	(0,0-7,0)	(1,5-7,5)
<b>PS vias óticas % <sup>b</sup></b>	28,1	31,8
<b>PS supratentorial % <sup>b</sup></b>	27,5*	4,5
<b>PS coluna vertebral % <sup>b</sup></b>	34,0	27,8
<b>PS tronco cerebral % <sup>b</sup></b>	32,0	50,0

EM- esclerose múltipla; PL- punção lombar; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; PS- primeiros sintomas. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram: <sup>a</sup>t-Student; <sup>b</sup> <sup>2</sup> de Pearson. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs BOC IgG negativa.

De seguida procedeu-se à avaliação das variáveis demográficas e clínicas iniciais dos doentes de EM com BOC IgM positivas e negativas. Não se observaram diferenças significativas relativamente à idade média e duração da doença na data da PL entre doentes com e sem bandas IgM. Também a distribuição de sexos, embora com uma

percentagem inferior de mulheres no grupo de doentes com BOC IgM positivas (58 % vs. 74%), não revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,157$ ).

Relativamente às manifestações clínicas iniciais da doença, não se observaram diferenças significativas nas principais vias afetadas. Quando analisada a hipótese de mais que um sintoma em paralelo, registou-se uma percentagem de 14,3% nas BOC IgM positivas vs. 12,7% nas IgM negativas, sem diferenças significativas ( $p=0,340$ ). Em relação ao grau de incapacidade evidenciado na data da PL, o EDSS foi mais elevado nos doentes com BOC IgM positivas (3,31 vs. 2,33) com diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,025$ ).

**Tabela 3.4** ó Características demográficas e clínicas iniciais dos doentes de EM com e sem BOC IgM

	<b>BOC IgM Positivas n=19</b>	<b>BOC IgM Negativas n=96</b>
<b>Idade na PL; anos</b> <sup>a</sup>	33,16±11,73	37,74±10,86
<b>(min-máx)</b>	(16-60)	(16-65)
<b>Sexo (F/M)</b> <sup>b</sup>	11/8	71/25
<b>Duração da EM até à PL; anos (min-máx)</b> <sup>a</sup>	5,44±8,76 (0-35)	3,95±6,57 (0-34)
<b>EDSS na PL</b> <sup>a</sup>	3,31±2,04*	2,33±1,17
<b>(min-máx)</b>	(1,5-7,5)	(0,0-7,0)
<b>PS vias óticas %</b> <sup>b</sup>	23,5	16,3
<b>PS supratentorial %</b> <sup>b</sup>	47,1	25,0
<b>PS coluna vertebral %</b> <sup>b</sup>	40,0	37,5
<b>PS tronco cerebral %</b> <sup>b</sup>	40,0	27,1

EM- esclerose múltipla; PL- punção lombar; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; PS- primeiros sintomas. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram: <sup>a</sup>t-Student; <sup>b</sup>  $\chi^2$  de Pearson. \* $p < 0,05$ ; vs BOC IgM negativa.

### 3.1.4 Relação das bandas oligoclonais IgG e IgM com a progressão da doença

#### 3.1.4.a BOC IgG e IgM versus EDSS

Seguidamente avaliou-se a evolução do EDSS ao longo do curso da doença nos doentes de EM com BOC IgG positivas e negativas. O valor médio do EDSS foi determinado nos seguintes momentos: 1 ano após o início da doença, aos 3, 5 e 10 anos e num período superior a 10 anos de doença, encontrando-se representado na Tabela 3.5. Na avaliação ao fim do 1º ano de doença, o EDSS no grupo de doentes com BOC IgG positivas foi de  $2,66 \pm 0,17$ , comparativamente a  $1,83 \pm 0,36$  nos doentes com BOC IgG negativas, revelando diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,03$ ). De salientar, contudo, que para este momento de avaliação o número de doentes com informação de EDSS disponível era muito baixo, representando apenas cerca de 30% de todos os doentes estudados. Com exceção do 1º ano de doença, os valores do EDSS nos doentes com BOC IgG positivas foram inferiores aos dos doentes com BOC IgG negativas em todos os outros momentos avaliados. Estas diferenças entre grupos só atingiram significado estatístico na avaliação superior a 10 anos após o início da doença ( $p=0,013$ ), com um EDSS no grupo com BOC IgG positivas de  $3,27 \pm 1,89$ , em comparação com  $5,0 \pm 2,22$  no grupo com BOC IgG negativas. Mais uma vez, para este último momento de avaliação, o número de doentes analisado foi bastante reduzido (32% da população total).

Realizou-se então um estudo semelhante para os doentes com BOC IgM positivas e negativas. Os resultados da variação do EDSS ao longo da doença em função da presença ou ausência de BOC IgM encontram-se descritos na Tabela 3.6. Os valores médios de EDSS no grupo de doentes com BOC IgM positivas foram sempre superiores aos dos doentes com BOC IgM negativas, contudo sem diferenças estatisticamente significativas. De referir, que para os momentos de avaliação após um ano do início da doença e superior a 10 anos, o número de doentes analisados é novamente apenas cerca de 30% da amostra total.

Avaliou-se também a influência da presença de BOC IgG e IgM no valor médio do EDSS atual (último EDSS registado). Conforme ilustrado na Figura 3.3, verificou-se que os doentes com BOC IgG negativas apresentavam valores de EDSS significativamente mais elevados ( $3,90 \pm 0,38$ ), indicativos de maior incapacidade, do que os doentes com BOC IgG positivas ( $2,95 \pm 0,15$ ;  $p=0,014$ ). Relativamente às BOC IgM, não se registaram

diferenças estatisticamente significativas no valor médio de EDSS de doentes com BOC IgM positivas e negativas ( $3,58 \pm 0,53$  vs.  $2,93 \pm 0,19$ ;  $p=0,175$ ).

**Tabela 3.5** Variação do EDSS ao longo da doença em doentes com BOC IgG positivas e negativas

EDSS	BOC IgG	BOC IgG
	Positivas	Negativas
<b>Após 1 ano de EM</b>	2,66±1,18*	1,83±0,88
(n)	(47)	(6)
<b>Aos 3 anos de EM</b>	2,64±1,23	2,89±1,55
(n)	(75)	(14)
<b>Aos 5 anos de EM</b>	2,81±1,56	3,18±1,73
(n)	(116)	(19)
<b>Aos 10 anos de EM</b>	2,82±1,60	3,81±2,12
(n)	(74)	(13)
<b>Superior a 10 anos de EM</b>	3,27±1,90*	5,0±2,22
(n)	(46)	(13)

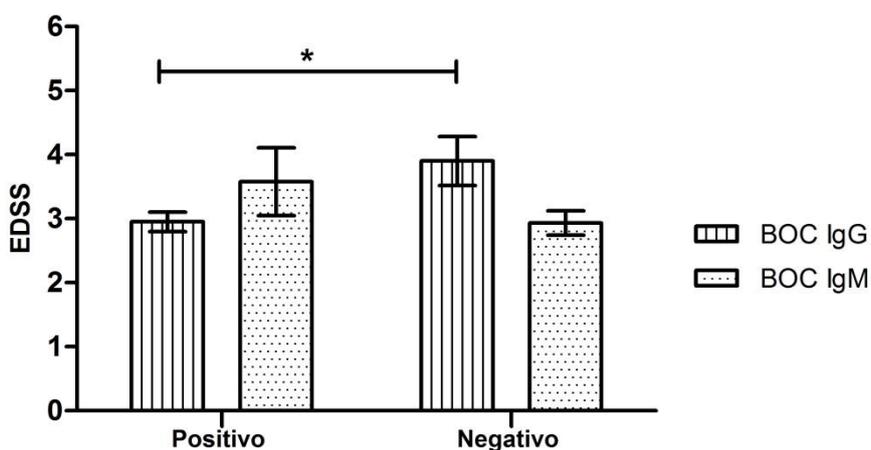
EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. O teste estatístico aplicado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  vs BOC IgG negativas.

Para explorar melhor a possível associação das BOC IgG e IgM com o grau de incapacidade atual dos doentes, dividiram-se os doentes de EM em dois grupos, consoante atingiram ou não um EDSS igual ou superior a 4 (EDSS <4 *versus* EDSS ≥4), e comparou-se a percentagem de doentes com BOC IgG e IgM positivas nos dois grupos. Como se pode observar na Tabela 3.7, apesar dos doentes com valores de EDSS <4 apresentarem uma tendência para uma percentagem maior de BOC IgG positivas, a diferença não atingiu significado estatístico. Quanto às BOC IgM, a percentagem de positivas foi semelhante nos dois subgrupos de doentes.

**Tabela 3.6** ó Variação do EDSS ao longo da doença em doentes com BOC IgM positivas e negativas

EDSS	BOC IgM	
	Positivas	Negativas
<b>Após 1 ano de EM</b>	3,64±2,37	2,40±0,77
(n)	(7)	(30)
<b>Aos 3 anos de EM</b>	2,71±1,50	2,68±1,34
(n)	(14)	(51)
<b>Aos 5 anos de EM</b>	3,31±2,04	2,75±1,48
(n)	(18)	(78)
<b>Aos 10 anos de EM</b>	4,58±2,40	2,80±1,57
(n)	(6)	(41)
<b>Superior a 10 anos de EM</b>	4,67±2,27	3,51±2,09
(n)	(6)	(31)

EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. O teste estatístico aplicado foi U de Mann-Whitney.



**Figura 3.3** ó Representação dos valores médios e erro padrão do EDSS atual em doentes de esclerose múltipla com BOC IgG positivas (n=152)/negativas (n=30) e BOC IgM positivas (n=19)/negativas (n=95). O teste estatístico aplicado foi U de Mann-Whitney. \*  $p < 0,05$ .

**Tabela 3.7** Distribuição das BOC IgG e IgM positivas, segundo o grau de incapacidade da EM

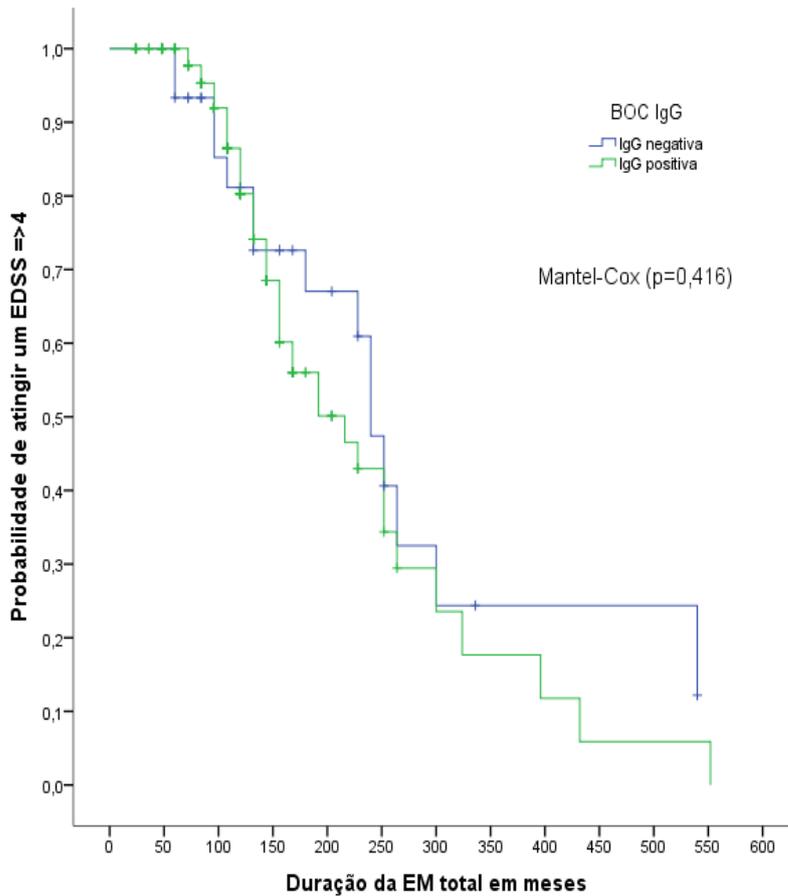
	EDSS < 4	EDSS × 4	Valor de <i>p</i>
<b>BOC IgG</b>			
(positivas/total)	102/117	50/65	<i>p</i> >0,05
%	87,2%	76,9%	
<b>BOC IgM</b>			
(positivas/total)	11/73	8/41	<i>p</i> >0,05
%	15,1%	19,5%	

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. O teste estatístico aplicado foi  $\chi^2$  de Pearson.

De seguida foi realizada uma análise de sobrevivência para testar a probabilidade de se atingir um valor de EDSS × 4, de acordo com a presença/ausência de BOC IgG e IgM. Na Figura 3.4 encontram-se representadas as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier em função da presença ou não de BOC IgG. A percentagem de doentes com BOC IgG positivas que atingiu um EDSS × 4 foi de 32,8%, enquanto esta percentagem atingiu 50% no grupo de doentes com BOC IgG negativas ( $p=0,074$ ). No entanto, não se registaram diferenças estatísticas no tempo para atingir este *score* de incapacidade (IgG positivas =  $236,34 \pm 20,64$  meses; IgG negativas =  $278,41 \pm 40,26$  meses;  $\chi^2(1) = 0,661$ ;  $p=0,416$ ).

Uma vez que a duração atual da doença era diferente entre os grupos de doentes de EM com BOC IgG positivas e negativas (IgG positivas =  $10,8 \pm 6,1$  anos, IgG negativas =  $15,6 \pm 10,3$  anos,  $p=0,017$ ; IgM positivas =  $12,6 \pm 9,6$  anos, IgM negativas =  $11,0 \pm 7,2$  anos,  $p=0,712$ ), o que poderia influenciar o EDSS, reanalisou-se a associação das BOC IgG e IgM com o grau de incapacidade, usando o critério de atingir ou não um EDSS igual ou superior a 4 ao fim de 10 anos. Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 3.8, que mostra que nos doentes com BOC IgG positivas, 40 em 112 (35,7%) atingiram um valor de EDSS × 4 ao fim de 10 anos de evolução da EM, enquanto nos doentes com BOC IgG negativas, 15 em 26 (57,7%) atingem este valor de incapacidade, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,039$ ).

Quanto às BOC IgM, observa-se que nos doentes com bandas, 46,2% (6 em 13) atingiram um valor de EDSS  $\times$  4 passados 10 anos, enquanto nos doentes sem BOC IgM, apenas 35,3% (24 em 68) atingiram este grau de incapacidade, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p=0,458$ ).

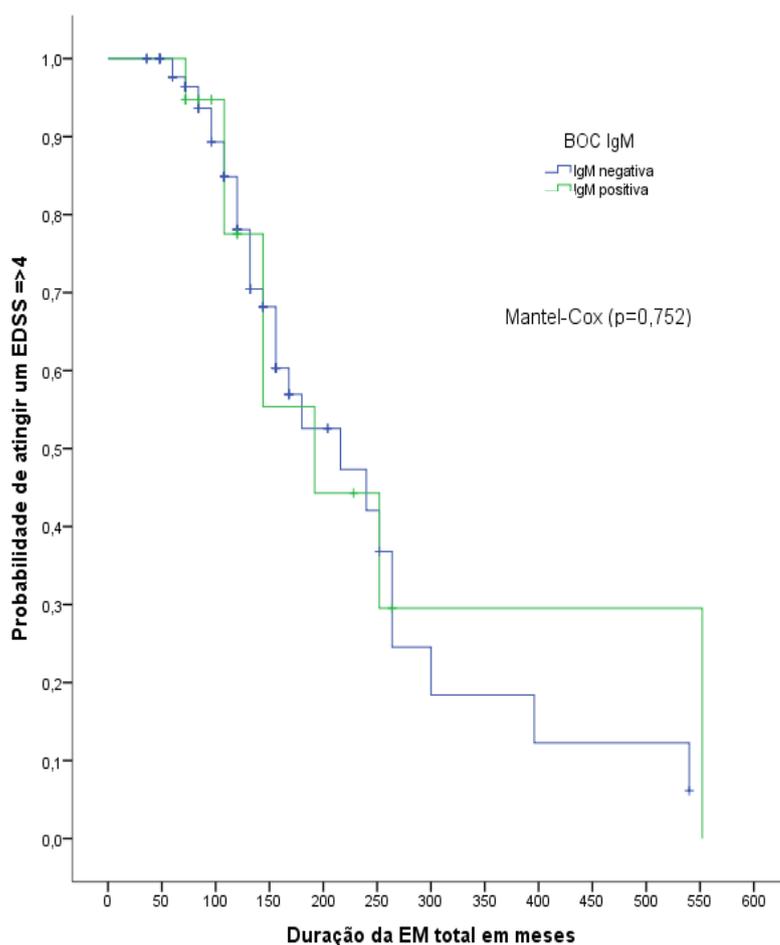


**Figura 3.4** Probabilidade de atingir um valor de EDSS  $\times$  4 em doentes de EM com BOC IgG positivas e negativas. EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; EM- esclerose múltipla; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG.

**Tabela 3.8** ó Distribuição das BOC IgG e IgM nos doentes que atingem ou não um EDSS igual ou superior a 4 aos 10 anos de doença

	BOC IgG		BOC IgM	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
<b>EDSS &lt; 4 aos 10 anos de EM</b>	72	11	7	44
<b>EDSS <math>\times</math> 4 aos 10 anos de EM</b>	40	15	6	24
<b>p value</b>	<i>p</i> =0,039		<i>p</i> =0,458	

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. O teste estatístico aplicado foi  $\chi^2$  de Pearson.



**Figura 3.5** ó Probabilidade de atingir um valor de EDSS  $\times$  4 em doentes de EM com BOC IgM positivas e negativas. EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; EM- esclerose múltipla; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM.

Analisou-se, ainda, a distribuição das BOC IgG e IgM em função dos doentes terem atingido ou não alguma vez, no decurso da doença, um valor de EDSS igual ou superior a 6. Assim, como descrito na Tabela 3.9, nos doentes com BOC IgG positivas, 24 em 152 (15,2%) atingiram um valor de EDSS  $\times$  6 alguma vez durante o curso da doença, enquanto nos doentes com BOC IgG negativas, 10 em 30 (33,3%) atingem este valor de incapacidade, sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,024$ ).

Quanto às BOC IgM, observa-se que nos doentes com bandas, 36,8% (7 em 19) atingiram um valor de EDSS  $\times$  6 alguma vez durante o curso da doença, enquanto nos doentes sem BOC IgM, esta percentagem baixou para 14,7% (14 em 95) sendo esta diferença estatisticamente significativa ( $p=0,023$ ).

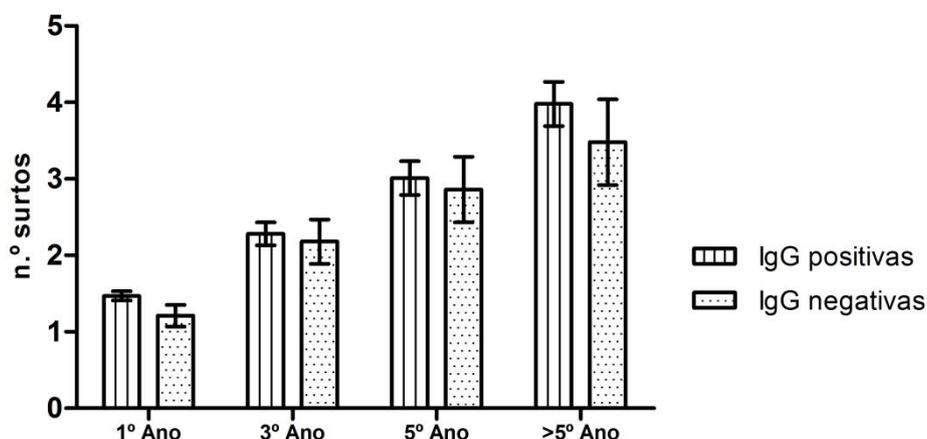
**Tabela 3.9** ó Distribuição das BOC IgG e IgM nos doentes que atingem ou não um EDSS igual ou superior a 6 alguma vez durante o curso da doença

	BOC IgG		BOC IgM	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
<b>Nunca EDSS 6</b>	128	20	12	81
<b>EDSS 6 alguma vez</b>	24	10	7	14
<b><i>p</i> value</b>	<i>p</i> =0,024		<i>p</i> =0,023	

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. O teste estatístico aplicado foi  $\chi^2$  de Pearson.

### 3.1.4.b Bandas oligoclonais IgG e IgM face ao número de surtos no curso da EM

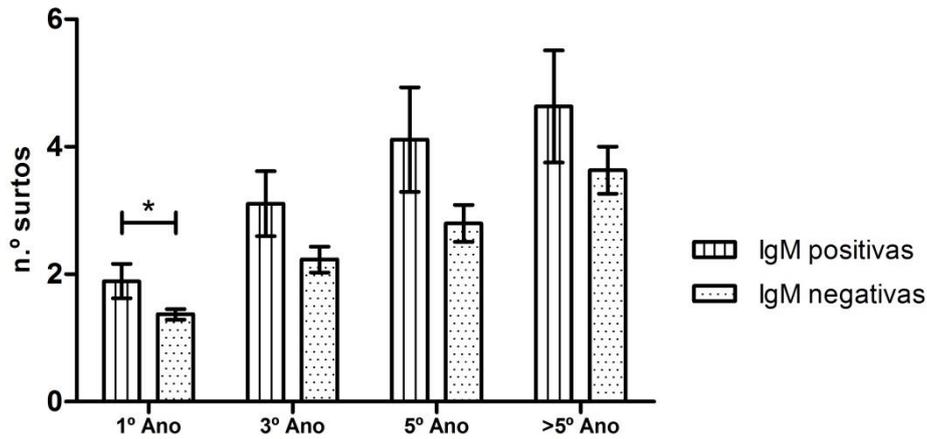
No seguimento da avaliação do curso da EM foi avaliado o número e a taxa de surtos nos doentes com fenótipo EMSR como indicadores de prognóstico. Assim, analisou-se a relação do número de surtos, durante o primeiro ano, até aos 3 e 5 anos e superior a 5 anos de EM com a presença/ausência de BOC IgG e IgM.



**Figura 3.6** é Relação das BOC IgG positivas e negativas, face ao número de surtos no curso da doença. BOC IgG- bandas oligoclonais IgG. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico aplicado foi U de Mann-Whitney.

Como seria de esperar, registou-se um aumento no número total de surtos ao longo do tempo de doença, mas sem diferenças significativas entre os doentes com BOC IgG positivas e negativas (ver Figura 3.6). Também se avaliou a taxa de surtos que se mostrou ligeiramente superior nas BOC IgG positivas, comparativamente às negativas, com exceção da taxa de surtos aos 5 anos. Porém, as diferenças não foram significativas.

No que respeita às BOC IgM, é possível observar na Figura 3.7, que a sua presença esteve sempre associada a um número total médio de surtos mais elevado, mas que esta diferença só atingiu significado estatístico no primeiro ano da EM ( $p=0,045$ ) e revelando uma tendência aos 3 anos ( $p=0,072$ ) e aos 5 anos ( $p=0,088$ ). Analisou-se também a taxa de surtos que se revelou superior nas BOC IgM positivas face às negativas, com exceção na avaliação a mais de 5 anos de doença. Tal como para o número de surtos, estas diferenças só foram significativas no primeiro ano da doença ( $p=0,045$ ) mostrando uma tendência aos 3 anos ( $p=0,072$ ) e aos 5 anos ( $p=0,071$ ).



**Figura 3.7** ó Relação das BOC IgM positivas e negativas, face ao número de surtos no curso da esclerose múltipla. BOC IgM- bandas oligoclonais IgM. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico aplicado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

### 3.1.4 c Bandas oligoclonais IgG e IgM em função do subtipo clínico

Analizou-se agora a distribuição das BOC positivas pelos subtipos clínicos da EM, com vista à indicação de marcadores de prognóstico, encontrando-se estes resultados apresentados na Tabela 3.10.

Relativamente às BOC IgG, estas foram positivas em 85,7% dos doentes que durante o curso da doença apresentaram um fenótipo do tipo surto-remissão (EMSR), em 88,9% dos doentes que evoluíram para uma forma secundária progressiva (EMSP), e em apenas 61,1% dos doentes que apresentaram uma forma primária progressiva (EMPP). Estas diferenças entre subtipos revelaram-se estatisticamente significativas ( $p=0,024$ ).

No que se refere à positividade das BOC IgM, face aos fenótipos clínicos dos doentes de EM, verificou-se que esta foi de 18,2% na EMSR, de 13,3% na EMPP e de 8,3% na EMSP, sem diferenças estatisticamente significativas.

Considerando apenas dois subtipos clínicos (formas progressivas *versus* não-progressivas), as BOC IgG mostraram uma positividade de 85,7% nas formas não-progressivas *versus* 75,0% nas formas progressivas, sem diferenças estatisticamente significativas. Para as BOC IgM, a relação foi de 18,2% de positivas nas formas não-progressivas e de 11,1% nas progressivas, também sem diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 3.10** ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG e IgM positivas pelos subtipos clínicos

	<b>EMSR</b>	<b>EMSP</b>	<b>EMPP</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>BOC IgG</b>				
<b>(positivas/total)</b>	126/147	16/18	11/18	<i>p</i> <0,05
<b>%</b>	85,7%	88,9%	61,1%	
<b>BOC IgM</b>				
<b>(positivas/total)</b>	16/88	1/12	2/15	<i>p</i> >0,05
<b>%</b>	18,2%	8,3%	13,3%	

EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM. O teste estatístico aplicado foi <sup>2</sup> de Pearson.

Avaliou-se também a possível associação entre a presença de BOC IgG e IgM e a percentagem de progressão de EMSR para a EMSP durante o curso da doença (Tabelas 3.11 e 3.12), com o intuito de identificar indicadores de prognóstico.

No que se refere às BOC IgG apenas 10,5% dos doentes com bandas positivas converteram para EMSP durante o tempo de duração da doença, enquanto nos doentes com BOC IgG negativas a percentagem de progressão foi de 6,7%, sem diferença estatisticamente significativa (*p*=0,524).

**Tabela 3.11** ó Distribuição das bandas oligoclonais IgG em função da conversão de EMSR para EMSP

	<b>BOC IgG</b>	<b>BOC IgG</b>
	<b>Positiva/Total</b>	<b>Negativa/Total</b>
<b>Conversão de EMSR para EMSP</b>	16/153	28/30
<b>Não conversão de EMSR para EMSP</b>	137/153	2/30
<b><i>p</i> value</b>	<i>p</i> =0,524	

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva. O teste estatístico aplicado foi <sup>2</sup> de Pearson.

**Tabela 3.12** ó Distribuição das bandas oligoclonais IgM em função da conversão de EMSR para EMSP

	BOC IgM Positiva/Total	BOC IgM Negativa/Total
<b>Conversão de EMSR para EMSP</b>	1/19	11/96
<b>Não conversão de EMSR para EMSP</b>	18/19	85/96
<b><i>p</i> value</b>	<i>p</i> =0,420	

BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva. O teste estatístico aplicado foi  $\chi^2$  de Pearson.

Relativamente às BOC IgM (Tabela 3.12) apenas 1 dos 19 doentes com BOC IgM positivas (5,3%) converteu para EMSP durante o tempo de duração da doença. Para os doentes com BOC IgM negativas, a percentagem de progressão de EMSR para EMSP foi de 11,5%, sem diferença estatisticamente significativa ( $p=0,420$ ).

### 3.1.4 d Bandas oligoclonais IgG e IgM versus terapêutica

De seguida investigou-se sobre a distribuição das BOC IgG e IgM positivas e negativas e o tipo de terapêutica específica de EM (1ª linha; 2ª linha) administrada aos doentes de EM no curso da doença. Na Tabela 3.13 comparou-se, nos doentes com e sem BOC IgG e IgM a percentagem de doentes que efetuou apenas terapia de 1ª linha com os que alguma vez necessitaram de terapia de 2ª linha durante o curso da doença. Verificou-se que nos doentes com BOC IgG positivas, 46% necessitaram de terapêutica de 2ª linha durante o curso da doença, enquanto nos doentes com BOC IgG negativas esta percentagem foi de 66%, atingido esta diferença significado estatístico ( $p=0,040$ ).

Quanto aos doentes com BOC IgM positivas, 42% necessitaram de terapêutica de 2ª linha durante o curso da doença. Esta percentagem não foi estatisticamente diferente nos doentes com BOC IgM negativas (45%). De notar que a duração atual média da EM nos doentes que apenas realizaram terapia de 1ª linha foi de  $10,06 \pm 6,82$  anos, significativamente inferior à dos doentes que alguma vez efetuaram terapêutica de 2ª linha ( $14,29 \pm 9,04$ ;  $p < 0,001$ ).

**Tabela 3.13** ó Distribuição das BOC IgG e IgM com a terapêutica

	BOC IgG		BOC IgM	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
	(n=150)	(n=29)	(n=19)	(n=92)
<b>Apenas terapêutica de 1ª linha</b>	81	10	11	51
<b>Alguma vez terapêutica de 2ª linha</b>	69	19	8	41
<b><i>p</i> value</b>	<i>p</i> =0,040		<i>p</i> =0,912	

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM. O teste estatístico aplicado foi  $\chi^2$  de Pearson.

## 3.2 Marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica no líquido cefalorraquídeo e soro

### 3.2.1 Caracterização da amostra

A análise dos marcadores de disfunção da BHE realizou-se num total de 105 amostras divididas por 3 grupos: 51 doentes de EM, 21 doentes com doença não inflamatória do SNC (DNI) e 33 doentes com outras doenças inflamatórias do SNC (DI). As características demográficas dos grupos estão representadas na Tabela 3.14. À data da punção lombar, o grupo de doentes de EM mostrou uma idade média de 36 anos (um mínimo de 16 e um máximo de 60 anos), significativamente inferior à média de idades do grupo com DI ( $p=0,015$ ), mas não do grupo DNI ( $p=0,937$ ). Verificou-se um predomínio do sexo feminino 68,6%, no grupo EM, sendo a relação mulher/homem de 2,18, sem diferenças significativas relativamente aos outros grupos ( $p=0,150$ ). Do ponto de vista clínico os doentes de EM apresentaram uma duração média da doença à data da PL de 4,61 anos, observando-se uma grande variabilidade. Analisada a distribuição da duração média da doença até à PL, por intervalos de tempo (< 5 anos; entre 5 e 10 anos; >10 anos), verificou-se que apenas cinco casos se encontravam no intervalo < 5 anos de duração da doença, encontrando-se 34 dos indivíduos no intervalo acima dos 10 anos. Os primeiros sintomas apresentados pelos doentes de EM registaram-se ao nível das vias óticas em 18,2% dos casos, supratentorial 23,6%, tronco cerebral 23,8%, coluna vertebral 31% e 15,8% dos doentes referiram sintomas iniciais em mais que uma das vias em simultâneo. O curso clínico da esclerose múltipla foi, em 72% dos casos, de surto-

remissão, com 16% de doentes a manifestarem formas secundárias progressivas e os restantes 12% formas primárias progressivas. Quanto ao grau de incapacidade avaliado à data da PL, pela escala de EDSS atingiu um valor médio de  $2,52 \pm 1,50$ , com um mínimo de 0,0 e um máximo de 7,0. Relativamente à presença de BOC, os doentes de EM apresentaram um predomínio de BOC IgG positivas em 94,1% (48/51) dos casos, verificando-se no grupo DNI uma positividade de 20,0% (4/20) e no grupo DI de 25,0% (8/32). Enquanto para as BOC IgM se registaram 12,2% (5/41) de positivas no grupo EM, nos controlos observou-se um resultado positivo em 10,0% (2/20) e em 8,0% (2/25) dos indivíduos nos grupos DNI e DI, respetivamente.

### 3.2.2 Determinação dos níveis de MMPs e TIMPs no LCR e soro

As concentrações médias das MMP-2 e MMP-9 e respetivos TIMPs (TIMP-2 e TIMP-1), em amostras de LCR e soro dos doentes que constituem os grupos EM, DNI e DI encontram-se representadas na Tabela 3.15. Para todos os parâmetros avaliados registaram-se concentrações mais elevadas nas amostras de soro, comparativamente às do LCR. De salientar que a concentração de TIMP-2 no soro se encontrava significativamente diminuída no grupo de doentes de EM relativamente aos grupos controlo, apresentando também uma tendência para uma diminuição no LCR. Após a aplicação do teste para correção de comparações múltiplas Dunn-Bonferroni verificou-se que estas diferenças se mantiveram significativas para a comparação com o grupo DNI no soro ( $p=0,025$ ) e marginalmente com o grupo DI no soro ( $p=0,058$ ). Observou-se também um aumento significativo dos níveis séricos de MMP-2 nos doentes de EM relativamente ao grupo DI ( $p=0,034$ ).

Analisou-se então a razão entre as MMPs e os respetivos TIMPs nas amostras de LCR e soro em estudo, que se encontram representadas na Figura 3.8. Com exceção da razão MMP-9/TIMP-1 no soro, todas as outras se revelaram significativamente aumentadas nos doentes de EM, comparativamente aos grupos controlo. A razão MMP-9/TIMP-1 no LCR registou diferenças em relação ao grupo DNI ( $p=0,020$ ), enquanto a razão MMP-2/TIMP-2 no LCR manifestou diferenças relativamente aos grupos DNI ( $p=0,011$ ) e DI ( $p=0,025$ ). Também a razão MMP-2/TIMP-2 no soro se apresentou significativamente aumentada no grupo de EM comparativamente aos dois outros grupos de doenças não inflamatórias e inflamatórias do SNC ( $p=0,001$  e  $p=0,035$ , respetivamente).

**Tabela 3.14** Caracterização demográfica e clínica dos doentes de EM e controlos (DNI e DI)

	<b>EM</b> <b>n=51</b>	<b>DNI</b> <b>n=21</b>	<b>DI</b> <b>n=33</b>
<b>Idade na PL; anos</b> <sup>a</sup>	36,28±11,52*	39,57±13,71	44,21±14,46
(min-máx)	(16-60)	(15-71)	(17-71)
<b>Sexo (F/M)</b> <sup>b</sup>	35/16	10/11	24/9
(F/M) %	(68,6/31,4)	(47,6/52,4)	(72,7/27,3)
<b>Duração da EM até à PL; anos (min-máx)</b>	4,61±7,45 (0-35)	----	----
<b>Subtipos</b>	37 EMSR; 8 EMSP; 6 EMPP	----	----
<b>EDSS na PL</b>	2,52±1,50	----	----
(min-máx)	(0,0-7,0)		
<b>PS vias óticas %</b>	18,2	----	----
<b>PS supratentorial %</b>	23,6	----	----
<b>PS coluna vertebral %</b>	31,0	----	----
<b>PS tronco cerebral %</b>	23,8	----	----

EM- esclerose múltipla; DNI- doença não inflamatória; DI- doença inflamatória; PL- punção lombar; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. PS- primeiros sintomas. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram <sup>a</sup>ANOVA com teste comparações múltiplas Dunn-Bonferroni; <sup>b</sup> <sup>2</sup> de Pearson. \*  $p < 0,05$  vs. DI.

**Tabela 3.15** ó Concentração de MMPs e TIMPs nas amostras de LCR e soro dos grupos EM, DNI e DI

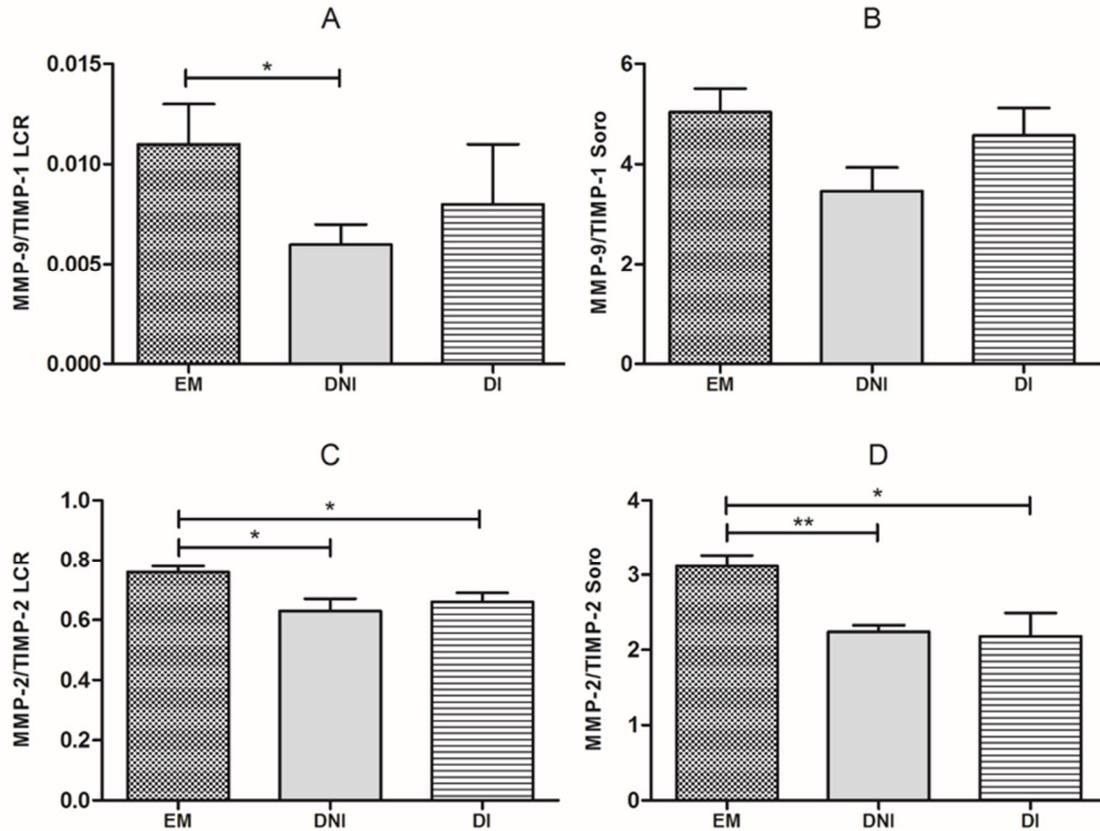
	<b>EM</b>	<b>DNI</b>	<b>DI</b>	<i>p-value</i>
	<b>n=51</b>	<b>n=14</b>	<b>n=17</b>	
<b>MMP-9 LCR</b>	0,32±0,04	0,20±0,03	0,27±0,07	0,26
<b>MMP-9 soro</b>	753,13±68,51	588,80±58,50	706,93±68,05	0,57
<b>MMP-2 LCR</b>	24,01±1,43	21,74±1,67	21,68±1,22	0,51
<b>MMP-2 soro</b>	194,98±9,77	160,19±8,89	142,77±19,18	<b>0,042</b>
<b>TIMP-1 LCR</b>	31,60±1,75	37,83±4,20	39,94±3,98	0,12
<b>TIMP-1 soro</b>	154,84±4,78	185,46±17,02	163,24±9,66	0,31
<b>TIMP-2 LCR</b>	30,64±1,44	35,18±2,71	33,77±1,38	0,052
<b>TIMP-2 soro</b>	64,79±3,17	71,88±3,18	70,55±3,66	<b>0,032</b>

EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi Kruskal Wallis.

**Tabela 3.16** ó Razão LCR/soro de MMPs e TIMPs nas amostras dos grupos EM, DNI e DI

<b>(LCR/soro)</b>	<b>EM</b>	<b>DNI</b>	<b>DI</b>	<i>p-value</i>
<b>MMP-9</b>	0,60±0,11	0,34±0,06	0,77±0,35	0,41
<b>MMP-2</b>	134,30±12,86	151,67±17,78	205,56±29,25	0,93
<b>TIMP-1</b>	222,15±16,60	230,14±20,26	252,33±35,07	0,65
<b>TIMP-2</b>	523,45±33,20	538,34±57,26	501,18±19,77	0,78

EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi Kruskal Wallis.



**Figura 3.8** Razão MMP/TIMP em LCR e soro nas amostras dos grupos EM, DNI e DI. **A-** MMP-9/TIMP-1 LCR; **B-** MMP-9/TIMP-1 soro; **C-** MMP-2/TIMP-2 LCR; **D-** MMP-2/TIMP-2 soro; EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; LCR- líquido cefalorraquideo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico utilizado foi Kruskal Wallis, seguido do teste comparações múltiplas Dunn-Bonferroni. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Calculou-se também, a razão entre os níveis no LCR e soro [(LCR/soro) x 1000] para todos os marcadores, não se observando diferenças significativas entre os grupos em estudo (ver Tabela 3.16).

### 3.2.3 Determinação dos níveis de moléculas de adesão (sICAM-1, sVCAM-1, sE-seletina) no LCR e soro

Os resultados da determinação dos níveis das moléculas de adesão sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Seletina no LCR e soro dos doentes de EM, DNI e DI encontram-se representados na Tabela 3.17. Como esperado, verificou-se que os níveis séricos foram sempre superiores aos do LCR, nos três grupos analisados. Registaram-se diferenças estatisticamente significativas nas concentrações médias das três moléculas no LCR, mas não no soro. Para a sICAM-1 no LCR, observou-se um aumento significativo no grupo EM ( $p=0,008$ ) e DI ( $p=0,003$ ) relativamente ao grupo de doenças não inflamatórias, enquanto para a sVCAM-1 os níveis estavam aumentados apenas no grupo DI relativamente aos dois outros grupos ( $p=0,001$  vs. EM;  $p=0,006$  vs. DNI). Já para a sE-Seletina, observou-se um aumento significativo no grupo de doentes de EM relativamente apenas ao grupo das outras doenças inflamatórias ( $p=0,004$ ).

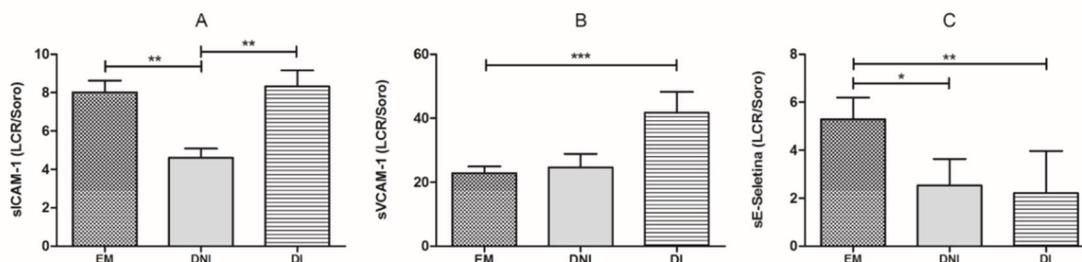
**Tabela 3.17** ó Concentração das moléculas de adesão celular em amostras de LCR e soro nos grupos EM, DI e DNI

	EM n=51	DNI n=13	DI n=18	<i>p-value</i>
<b>sICAM-1 LCR</b>	1,38±0,09	0,95±0,10	1,35±0,11	<b>0,008</b>
<b>sICAM-1 soro</b>	201,53±10,02	216,11±13,59	182,13±13,66	0,42
<b>sVCAM-1 LCR</b>	10,26±0,44	9,64±0,90	19,20±3,40	<b>0,003</b>
<b>sVCAM-1 soro</b>	519,81±30,65	486,63±53,64	485,53±40,76	0,92
<b>sE-seletina LCR</b>	0,105±0,016	0,055±0,024	0,023±0,014	<b>0,008</b>
<b>sE-seletina soro</b>	30,47±2,25	40,23±5,67	30,77±4,24	0,25

EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; sICAM-1- *soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi Kruskal Wallis.

De seguida avaliaram-se as razões LCR/soro das CAM em investigação e, todas apresentaram diferenças significativas, como representado na Figura 3.9. Tal como se

observou para os níveis no LCR, a razão sICAM-1 LCR/soro estava significativamente aumentada no grupo EM ( $p=0,001$ ) e DI ( $p=0,002$ ) relativamente ao grupo de doenças não inflamatórias, enquanto a razão sVCAM-1 LCR/soro estava aumentada apenas no grupo DI relativamente aos doentes de EM ( $p <0,001$ ). No caso da razão sE-Seletina LCR/soro observou-se um aumento significativo no grupo de doentes de EM relativamente ao grupo das outras doenças inflamatórias ( $p=0,001$ ) e ainda em relação ao grupo DNI ( $p=0,037$ ).



**Figura 3.9** Razão LCR/soro de sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Seletina nas amostras dos grupos EM, DNI e DI. EM- esclerose múltipla; DI- doença inflamatória; DNI- doença não inflamatória; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi o Kruskal Wallis, seguido do teste comparações múltiplas Dunn-Bonferroni.\*  $p <0,05$ ; \*\*  $p <0,01$ ; \*\*\*  $p <0,001$ .

Para melhor perceber a relação entre MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Seletina em amostras de LCR e soro de doentes de EM, aplicou-se a correlação de Pearson. Estes resultados estão apresentados na Tabela 3.18, onde se encontram os coeficientes de correlação e significância apenas das correlações que se revelaram estatisticamente significativas. Das 22 correlações encontradas no estudo, a sE-Seletina no LCR foi a molécula que apresentou mais correlações (sete), das quais duas foram negativas (sVCAM-1 e TIMP-1 no soro), sendo as mais robustas observadas com o TIMP-2 e sICAM-1 no soro (coeficientes de correlação de 0,641 e 0,648, respetivamente). Também se registaram correlações entre a MMP-2 e o respetivo inibidor (TIMP-2), em ambos os fluídos, mas não entre a MMP-9 e o seu inibidor TIMP-1. Para nenhum dos marcadores analisados se observou uma correlação entre os seus níveis no LCR e soro. As correlações com coeficientes de correlação mais altos foram registadas entre MMP-2 e o respetivo inibidor no LCR (TIMP-2;  $\rho=0,691$ ;  $p <0,001$ ) e também entre MMP-2 e sICAM-1 no LCR ( $\rho=0,727$ ;  $p <0,001$ ).

**Tabela 3.18** ó Correlação MMPs, TIMPs, sICAM-1, sVCAM-1, e sE-Seletina em amostras de LCR e soro nos doentes de EM

	MMP-9 S	MMP-9 L	MMP-2 S	MMP-2 L	TIMP-1 S	TIMP-1 L	TIMP-2 S	TIMP-2 L	sICAM-1 S	sICAM-1 L	sVCAM-1 S	sVCAM-1 L	sE-Seletina S	sE-Seletina L
MMP-9 S	1		-0,313 0,006				-0,396 0,000							
MMP-9 L		1												0,273 0,038
MMP-2 S			1				0,379 0,001							0,437 0,002
MMP-2 L				1		0,356 0,003	0,691 0,000		0,727 0,000					0,365 0,003
TIMP-1 S					1									-0,302 0,031
TIMP-1 L						1	0,608 0,000		0,419 0,001		0,420 0,000			
TIMP-2 S							1		0,333 0,003		-0,234 0,042		0,222 0,045	0,641 0,000
TIMP-2 L								1		0,456 0,000				
sICAM-1 S									1				0,388 0,000	0,648 0,000
sICAM-1 L										1		0,384 0,001		
sVCAM-1 S											1			-0,420 0,003
sVCAM-1 L												1		
sE-Seletina S													1	
sE-Seletina L														1

L- líquido cefalorraquídeo; S- soro; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1-*soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*. Os resultados são apresentados na forma de coeficiente de correlação e *p-value*. O teste estatístico aplicado foi a correlação de Pearson.

### **3.2.4 Relação dos marcadores de disfunção da BHE com a progressão da EM**

#### **3.2.4.a Marcadores de disfunção da BHE *versus* EDSS**

No sentido de investigar sobre a possível relação dos marcadores de disfunção da BHE, com o grau de incapacidade atual dos doentes de EM, dividiu-se o grupo EM em função do EDSS ter ou não atingido um valor igual ou superior a 4 na última avaliação (EDSS < 4 *versus* EDSS  $\times$  4), e compararam-se os valores médios dos marcadores nos dois grupos. De notar que o grupo com EDSS < 4 (n=31) mostrou uma idade média na data da PL (32,88 $\pm$ 9,65 anos) significativamente inferior à do grupo com EDSS  $\times$  4 (42,76 $\pm$ 12,21 anos; n=20;  $p=0,002$ ). Registou-se um predomínio do sexo feminino e uma duração total da doença sem diferenças significativas entre os grupos. A distribuição dos subtipos clínicos mostrou diferenças significativas ( $p < 0,001$ ), revelando que no grupo EDSS < 4 a quase totalidade dos doentes teve um curso da doença do tipo EMSR, com um único caso de EMPP. Relativamente ao grupo EDSS  $\times$  4 verificou-se uma divisão fenotípica de 7 indivíduos com EMSR, 8 com EMSP e 5 com EMPP.

Como é possível observar na Tabela 3.19, apenas se registou um aumento significativo na sVCAM-1 sérica no grupo EDSS  $\times$  4 comparativamente ao grupo com EDSS < 4 ( $p=0,029$ ). Para todos os outros marcadores não se registaram diferenças significativas entre os dois grupos.

Também não se registaram diferenças nos valores médios das razões das MMPs com os respetivos TIMPs (MMP/TIMP), quer no LCR quer no soro dos doentes de EM que atingiram ou não um EDSS  $\times$  4. De notar que, com exceção da razão MMP-2/TIMP-2 no soro (EDSS < 4=2,90 $\pm$ 0,12; EDSS  $\times$  4=3,48 $\pm$ 0,32;  $p=0,152$ ), todas as outras razões apresentaram valores médios superiores no grupo EDSS < 4, comparativamente ao grupo EDSS  $\times$  4, com a razão MMP-9/TIMP-1 no LCR, a aproximar-se do significado estatístico ( $p=0,09$ ).

A Tabela 3.20 apresenta os resultados das razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM que atingem diferentes graus de incapacidade (EDSS < 4 *vs.* EDSS  $\times$  4). Aqui, foi possível observar um aumento significativo da razão LCR/soro da sE-Seletina no grupo de doentes de EM com EDSS < 4 ( $p=0,036$ ).

**Tabela 3.19** ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM *versus* incapacidade

	EDSS < 4		EDSS × 4	
	(n=31)		(n=20)	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,35±0,05	798,52±87,65	0,27±0,067	682,78±110,73
<b>MMP-2</b>	23,56±1,45	186,25±12,24	24,89±3,20	209,53±16,05
<b>TIMP-1</b>	30,76±1,41	157,50±6,93	33,34±4,58	150,73±5,83
<b>TIMP-2</b>	30,51±1,78	65,52±4,41	30,93±2,52	63,55±4,23
<b>sICAM-1</b>	1,35±0,08	213,56±12,50	1,46±0,21	183,49±16,18
<b>sVCAM-1</b>	9,90±0,53	472,02±38,43	10,95±0,77	593,88±47,06*
<b>sE-Seletina</b>	0,113±0,019	29,32±2,64	0,088±0,027	32,26±4,08

EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  vs EDSS <4.

Para melhor explorar uma possível associação dos marcadores de disfunção da BHE com o grau de incapacidade do *score* de EDSS <4; × 4, aplicou-se um modelo de regressão logística para avaliar a contribuição das diferentes variáveis como preditivas da disrupção da BHE. Variáveis demográficas (sexo e idade na PL), clínicas (duração da EM na PL) e bioquímicas (BOC IgG e IgM, sVCAM-1 soro, razão LCR/soro da sE-Seletina e razão MMP-9/TIMP-1 LCR) foram testadas. Apenas se observou uma contribuição significativa para a sVCAM-1 soro  $p=0,020$  e marginalmente para a razão MMP-9/TIMP-1 no LCR com  $p=0,059$ .

Uma vez que o grau de incapacidade está relacionado com a duração da doença, reanalisou-se a associação das concentrações dos vários marcadores de disrupção da BHE com o *score* de EDSS em função do tempo. Para tal, dividiram-se os doentes de EM segundo o critério de atingirem ou não um valor de EDSS igual ou superior a 4 ao fim de 10 anos de doença (EDSS × 4 aos 10 anos de EM), estando os resultados apresentados na Tabela 3.21. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos. Contudo,

importa salientar a tendência manifestada pela MMP-9 no soro, que se encontrava aumentada no grupo com EDSS <4 aos 10 anos de EM ( $p=0,075$ ). Enquanto a MMP-2 soro mostrou uma tendência para aumentar no grupo EDSS  $\times$  4 aos 10 anos de EM com ( $p=0,063$ ).

**Tabela 3.20** Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM *versus* incapacidade (EDSS <4;  $\times$  4)

	EDSS < 4 (n=31)	EDSS $\times$ 4 (n=20)
<b>MMP-9/TIMP-1 LCR</b>	0,012 $\pm$ 0,001	0,011 $\pm$ 0,003
<b>MMP-9/TIMP-1 soro</b>	5,39 $\pm$ 0,62	4,51 $\pm$ 0,73
<b>MMP-2/TIMP-2 LCR</b>	0,77 $\pm$ 0,028	0,73 $\pm$ 0,038
<b>MMP-2/TIMP-2 soro</b>	2,90 $\pm$ 0,123	3,48 $\pm$ 0,32
<b>LCR/soro</b>		
<b>MMP-9</b>	0,57 $\pm$ 0,15	0,64 $\pm$ 0,19
<b>MMP-2</b>	133,97 $\pm$ 14,26	134,80 $\pm$ 24,73
<b>TIMP-1</b>	217,62 $\pm$ 18,30	229,10 $\pm$ 32,11
<b>TIMP-2</b>	524,20 $\pm$ 45,88	522,00 $\pm$ 42,59
<b>sICAM-1</b>	7,45 $\pm$ 0,79	8,75 $\pm$ 0,98
<b>sVCAM-1</b>	24,67 $\pm$ 2,97	20,16 $\pm$ 2,31
<b>sE-Selelina</b>	6,45 $\pm$ 1,16*	3,53 $\pm$ 1,39

EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecido da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Selelina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

De seguida analisaram-se as razões MMPs/TIMPs nas amostras de LCR e soro registando-se na razão MMP-9/TIMP-1 soro, um aumento significativo no grupo EDSS < 4 aos 10 anos de EM (5,45 $\pm$ 0,68 vs. 3,99 $\pm$ 0,76;  $p=0,046$ ), ver Figura 3.10.

**Tabela 3.21** ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM *versus* incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM)

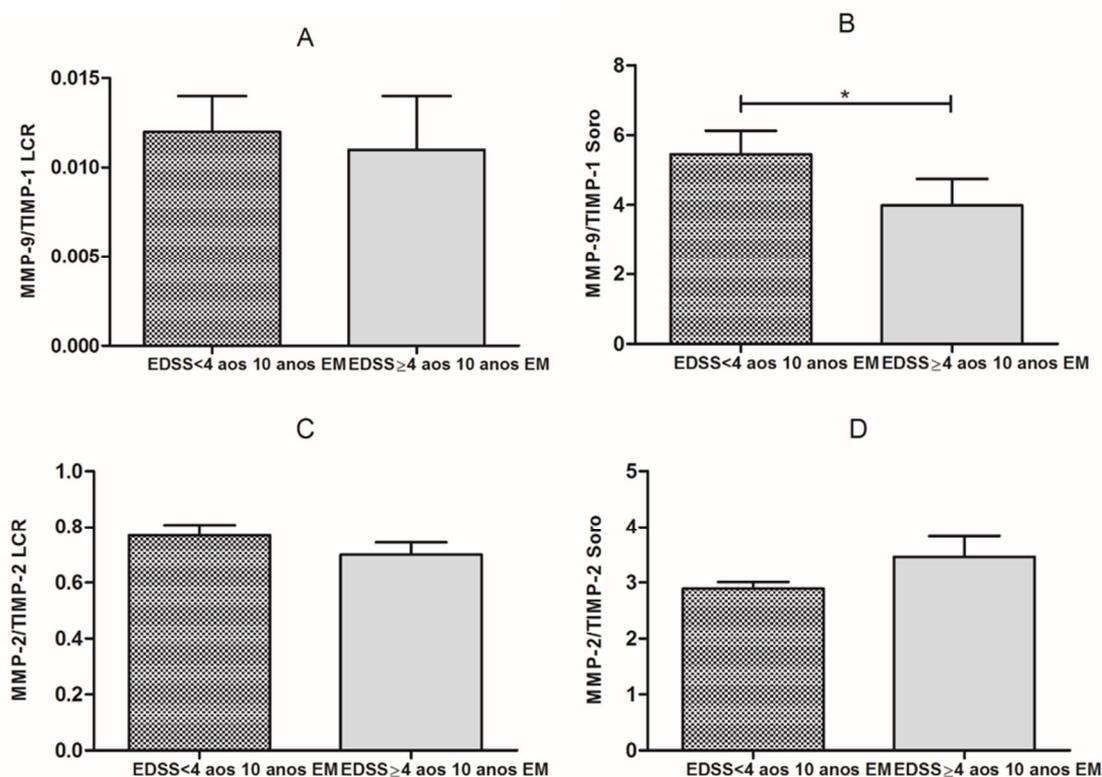
	EDSS < 4 aos 10 anos de EM		EDSS × 4 aos 10 anos de EM	
	(n=28)		(n=18)	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,35±0,062	785,22±92,0	0,27±0,067	607,54±109,72
<b>MMP-2</b>	25,64±2,65	185,68±13,45	22,26±1,70	219,66±16,92
<b>TIMP-1</b>	31,06±1,60	154,46±7,24	33,15±4,61	153,33±6,88
<b>TIMP-2</b>	30,90±2,29	64,97±4,63	30,80±2,72	67,84±4,71
<b>sICAM-1</b>	1,48±0,17	218,74±13,59	1,25±0,12	180,73±17,28
<b>sVCAM-1</b>	10,25±0,65	501,34±40,78	10,67±0,87	558,63±53,46
<b>sE-Selelina</b>	0,14±0,023	31,38±2,67	0,10±0,026	31,12±4,67

EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Selelina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

Mantendo a sequência das análises anteriores, calcularam-se também as razões LCR/soro dos diferentes marcadores de disfunção da BHE (MMP-9, MMP-2, TIMP-1, TIMP-2, sICAM-1, sVCAM-1 e sE-Selelina) nos doentes de EM divididos pelos grupos EDSS < 4 aos 10 anos de EM *vs.* EDSS × 4 aos 10 anos de EM (ver Tabela 3.22). Com exceção da MMP-9, TIMP-1 e sICAM-1 as razões LCR/soro dos outros marcadores apresentaram valores médios superiores no grupo EDSS < 4 aos 10 anos de EM, não atingindo, contudo, significado estatístico.

### 3.2.4.b Marcadores de disfunção da BHE em função do subtipo clínico

Para explorar a possível expressão diferencial dos marcadores de disfunção da BHE nos diferentes subtipos clínicos de EM, subdividiu-se o grupo de doentes de EM em formas surto-remissão (EMSR; n=37) e progressivas (n=14), incluindo nestas, as formas EMSP e EMPP.



**Figura 3.10** Razão MMP/TIMP em amostras de LCR e soro em doentes de EM versus incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM). **A-** MMP-9/TIMP-1 LCR; **B-** MMP-9/TIMP-1 soro; **C-** MMP-2/TIMP-2 LCR; **D-** MMP-2/TIMP-2 soro; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  vs EDSS × 4 aos 10 anos EM.

Quanto às principais características demográficas e clínicas, ambos os doentes de EM com formas SR e progressivas apresentaram um predomínio do sexo feminino, sendo a idade média na data da PL significativamente menor nas formas EMSR ( $33,83 \pm 10,69$  vs.  $44,50 \pm 10,63$ ;  $p=0,003$ ), assim como a duração total da doença ( $11,57 \pm 7,14$  vs.  $17,29 \pm 9,31$ ;  $p=0,04$ ). Também a duração da EM na data da punção lombar era superior e estatisticamente diferente nas formas progressivas ( $8,61 \pm 9,13$ ) anos em comparação com

as EMSR ( $3,42 \pm 6,53$ ;  $p=0,021$ ). Quanto ao grau de incapacidade, como seria de esperar, os doentes do grupo EMSR registaram um valor médio de EDSS na última avaliação ( $2,30 \pm 1,44$ ) significativamente inferior ao grupo progressivo ( $5,46 \pm 1,63$ ;  $p < 0,001$ ). O EDSS na data da PL, também foi superior e diferente nas formas progressivas ( $4,13 \pm 2,02$ ) face às formas surto-remissão ( $2,18 \pm 1,18$  e  $p=0,017$ ).

**Tabela 3.22** Razão LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM *versus* incapacidade (EDSS < 4; × 4 aos 10 anos de EM)

LCR/soro	EDSS < 4 aos 10 anos	EDSS × 4 aos 10 anos
	de EM	de EM
<b>MMP-9</b>	0,57±0,17	0,65±0,19
<b>MMP-2</b>	148,44±22,65	109,36±9,22
<b>TIMP-1</b>	220,89±19,75	226,54±32,68
<b>TIMP-2</b>	531,14±48,77	494,31±50,50
<b>sICAM-1</b>	7,83±0,89	8,19±1,01
<b>sVCAM-1</b>	24,06±3,26	21,01±2,49
<b>sE-Seletina</b>	5,44±0,86	4,79±1,69

EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Seletina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

As concentrações das diferentes MMPs, TIMPs e CAMs no LCR e soro dos doentes com formas EMSR e progressivas encontram-se compiladas na Tabela 3.23. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para nenhum dos marcadores avaliados. Contudo, o aumento da concentração de MMP-9 e diminuição da sVCAM-1 no LCR dos doentes EMSR estiveram muito perto de atingir significado estatístico ( $p=0,053$  e  $p=0,067$ , respetivamente).

A análise das razões MMPs/TIMPs no LCR e soro dos doentes com formas EMSR e progressivas, encontra-se representada na Figura 3.11 Observou-se um aumento significativo da razão MMP-9/TIMP-1 no LCR dos doentes com um curso da doença do

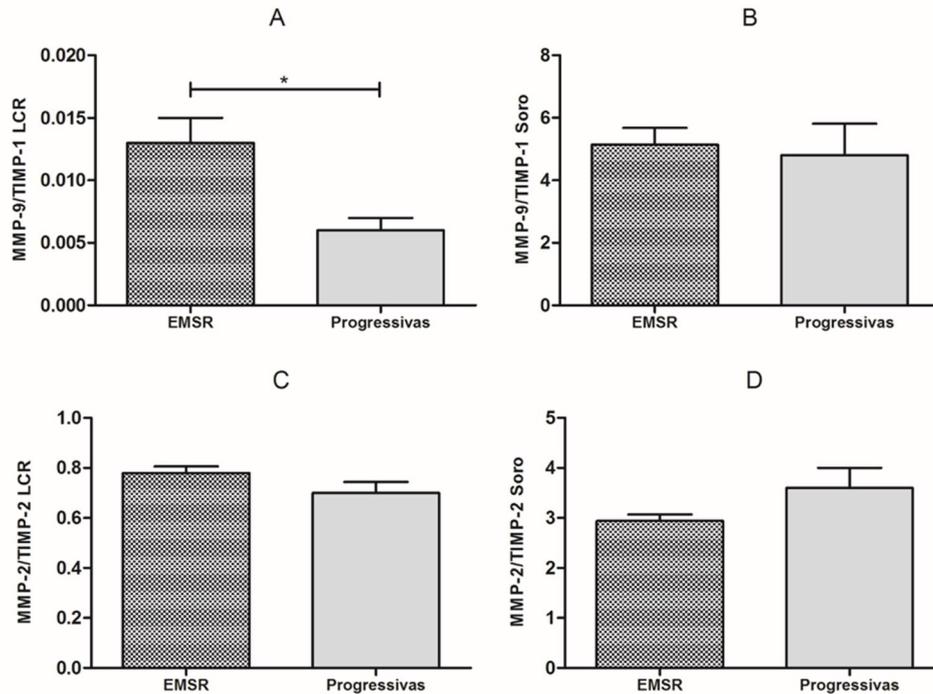
tipo surto-remissão ( $p=0,010$ ), acompanhado duma tendência para uma diminuição da razão MMP-2/TIMP-2 no soro ( $p=0,076$ ).

**Tabela 3.23** ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM (EMSR *versus* progressivas)

	EMSR (n=37)		Progressivas (n=14)	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,37±0,05	760,06±76,50	0,19±0,02	734,83±151,30
<b>MMP-2</b>	24,31±1,76	186,60±11,01	22,98±2,08	217,54±19,92
<b>TIMP-1</b>	29,88±1,39	156,53±6,27	36,49±5,36	150,40±5,52
<b>TIMP-2</b>	29,85±1,72	64,96±3,87	32,95±2,58	64,35±5,53
<b>sICAM-1</b>	1,40±0,11	207,81±11,31	1,32±0,14	183,67±21,23
<b>sVCAM-1</b>	9,84±0,49	490,90±33,72	11,66±0,91	596,21±64,98
<b>sE-Seletina</b>	0,11±0,018	31,69±2,59	0,11±0,034	27,25±4,58

EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Seletina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

Quanto às razões LCR/soro das diferentes MMPs, TIMPs e CAMs avaliadas no estudo, não se registaram diferenças estatisticamente significativas, havendo, contudo, uma tendência geral (com exceção das razões LCR/soro do TIMP-1 e sICAM-1) para os valores médios serem superiores no grupo EMSR, ver Tabela 3.24.



**Figura 3.11** ó Razão MMP/TIMP em amostras de LCR e soro em doentes de EM (EMSR versus progressivas). **A-** MMP-9/TIMP-1 LCR; **B-** MMP-9/TIMP-1 soro; **C-** MMP-2/TIMP-2 LCR; **D-** MMP-2/TIMP-2 soro; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; LCR- líquido cefalorraquídeo. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \**p* <0,05 vs progressivas.

**Tabela 3.24** ó Razão LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM (EMSR versus progressivas)

LCR/soro	EMSR	Progressivas
<b>MMP-9</b>	0,67±0,16	0,46±0,13
<b>MMP-2</b>	143,82±17,30	109,72±8,77
<b>TIMP-1</b>	208,82±16,91	251,03±37,62
<b>TIMP-2</b>	516,44±43,40	540,38±45,53
<b>sICAM-1</b>	7,89±0,74	9,61±1,33
<b>sVCAM-1</b>	23,17±2,53	22,13±3,16
<b>sE-Selelina</b>	5,76±1,07	4,22±1,76

EMSR- Esclerose múltipla surto-remissão; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-

seletina- *soluble E-selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

### 3.2.4.c Marcadores de disfunção da BHE *versus* terapêutica

De seguida foi avaliada a concentração dos marcadores de disfunção da BHE (MMP-2, MMP-9, TIMP-2, TIMP-1, sICAM-1, sVCAM-1e sE-Seletina) e respetivas razões em amostras de LCR e soro em função a posterior terapêutica realizada pelos doentes de esclerose múltipla durante o curso da doença. Estes foram separados em dois grupos: doentes que no curso da doença apenas efetuaram terapia de 1ª linha e doentes que alguma vez necessitaram de terapia de 2ª linha. De notar que não se observaram diferenças significativas nos parâmetros demográficos (idade, sexo) e clínicos destes dois grupos de doentes à data da PL (duração da doença, EDSS).

As concentrações das MMPs, TIMPs e CAMs estudadas nestes dois grupos apresentam-se na Tabela 3.25. Como é possível observar, não se encontraram diferenças estatisticamente significativas nos valores médios de nenhum dos marcadores avaliados.

**Tabela 3.25** ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM *versus* terapêutica

	Apenas terapia de 1ª linha (n=29)		Alguma vez terapia de 2ª linha (n=19)	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,32±0,054	759,46±85,45	0,33±0,068	697,26±104,37
<b>MMP-2</b>	25,46±2,34	191,58±12,16	21,56±1,31	201,54±17,52
<b>TIMP-1</b>	30,93±1,53	161,95±6,69	32,05±4,12	148,94±6,20
<b>TIMP-2</b>	30,19±2,10	67,23±4,65	30,88±2,09	61,07±4,21
<b>sICAM-1</b>	1,41±0,15	213,34±13,18	1,31±0,09	180,80±15,55
<b>sVCAM-1</b>	10,10±0,59	496,98±41,96	10,28±0,67	562,39±48,12
<b>sE-Seletina</b>	0,12±0,02	30,03±2,83	0,07±0,02	31,66±4,08

EM- esclerose múltipla; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Seletina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

Procedeu-se também à análise das razões MMP/TIMP no LCR e soro. Assim como à avaliação das razões LCR/soro de cada um dos marcadores para os dois subgrupos de doentes, conforme Tabela 3.26. Em nenhum dos casos se observou diferenças com significado estatístico.

**Tabela 3.26** Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM *versus* terapia

	Apenas terapia de 1ª linha	Alguma vez terapia de 2ª linha
<b>MMP-9/TIMP-1 LCR</b>	0,010±0,001	0,014±0,003
<b>MMP-9/TIMP-1 soro</b>	4,84±0,49	4,86±0,82
<b>MMP-2/TIMP-2 LCR</b>	0,79±0,03	0,70±,04
<b>MMP-2/TIMP-2 soro</b>	2,94±0,12	3,45±0,33
<b>LCR/soro</b>		
<b>MMP-9</b>	0,59±0,16	0,64±0,20
<b>MMP-2</b>	143,49±21,52	117,32±9,61
<b>TIMP-1</b>	205,32±16,22	229,98±34,05
<b>TIMP-2</b>	507,20±51,40	544,92±39,73
<b>sICAM-1</b>	8,22±0,97	8,52±0,88
<b>sVCAM-1</b>	24,32±3,10	19,85±2,18
<b>sE-Seletina</b>	6,02±1,26	3,96±1,50

LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney.

### 3.2.5 Relação dos marcadores de disfunção da BHE com as bandas oligoclonais

Seguidamente tentou analisar-se a eventual relação entre as concentrações no LCR e soro das metaloproteinases e respetivos inibidores tecidulares e moléculas de adesão celular nos doentes de EM, com a presença ou não de BOC IgG e IgM. Dado o desequilíbrio

observado na distribuição das BOC IgG e IgM positivas e negativas, esta análise encontra-se fortemente limitada pelo número muito baixo de doentes de EM com BOC IgG negativas e IgM positivas incluídos (ver Tabelas 3.27 e 3.28). Ainda assim, observou-se um aumento significativo dos níveis de sICAM-1 no soro dos doentes com BOC IgG positivas em comparação com os doentes com BOC IgG negativas ( $p=0,005$ ), bem como uma diminuição da concentração de TIMP-2 no LCR nos doentes com BOC IgM positivas ( $p=0,042$ ).

**Tabela 3.27** Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM e BOC IgG positivas e negativas

	BOC IgG Positivas		BOC IgG Negativas	
	n=48		n=3	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,332±0,043	745,29±73,46	0,156±0,0	845,27±148,40
<b>MMP-2</b>	24,25±1,50	193,41±10,20	19,98±3,54	218,55±35,37
<b>TIMP-1</b>	30,70±1,24	153,44±4,92	44,46±22,41	177,35±18,37
<b>TIMP-2</b>	30,68±1,51	65,62±3,32	29,99±5,33	52,22±6,58
<b>sICAM-1</b>	1,41±0,95	209,52±9,51**	1,03±0,27	76,35±8,50
<b>sVCAM-1</b>	10,13±0,45	513,56±31,91	12,47±1,08	619,75±105,95
<b>sE-Selelina</b>	0,016±0,007	31,34±2,32	0,11±0,02	16,48±4,95

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercellular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Selelina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \*\* $p < 0,01$  vs BOC IgG negativas.

Calcularam-se também, as razões MMP/TIMP em LCR e soro em relação à presença/ausência das BOC IgG e IgM, contudo não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros analisados (ver Tabela 3.29).

**Tabela 3.28** ó Concentração de MMPs, TIMPs e CAMs nas amostras de LCR e soro em doentes de EM e BOC IgM positivas e negativas

	BOC IgM Positivas		BOC IgM Negativas	
	n=5		n=36	
	LCR	Soro	LCR	Soro
<b>MMP-9</b>	0,22±0,068	544,72±108,37	0,31±0,04	846,60±89,87
<b>MMP-2</b>	29,41±11,07	244,59±33,10	23,57±1,34	189,16±9,69
<b>TIMP-1</b>	25,31±3,53	154,61±5,86	32,66±1,99	147,28±13,73
<b>TIMP-2</b>	24,14±2,87*	71,44±12,45	31,94±1,58	64,72±3,82
<b>sICAM-1</b>	1,91±0,68	191,23±11,05	1,35±0,07	250,50±55,11
<b>sVCAM-1</b>	13,31±1,80	484,85±76,50	10,42±0,46	550,76±38,51
<b>sE-Selelina</b>	0,127±0,068	30,0±2,52	0,09±0,017	30,0±2,52

BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-Selelina- *soluble E-Selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e as unidades em ng/mL. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  vs BOC IgM negativas.

Procedeu-se ainda à análise da razão [(LCR/soro) x 1000] de todos os marcadores em estudo para os doentes de EM com e sem BOC IgG e IgM. Foi possível observar um aumento significativo da razão MMP-9 ( $p=0,037$ ) e uma tendência para o mesmo aumento na razão sE-Selelina ( $p=0,052$ ), nos doentes com BOC IgG positivas em comparação com os doentes sem BOC IgG. Em contrapartida, o quociente entre os níveis de LCR e soro para a molécula ICAM-1 revelou-se significativamente inferior ( $p=0,030$ ) nos doentes de EM com BOC IgG.

Já para os doentes com BOC IgM positivas e negativas, não se observaram diferenças significativas nas razões LCR/soro dos diferentes parâmetros avaliados. Apenas se verificou uma tendência para a diminuição na razão TIMP-2 ( $p=0,078$ ) nos doentes com BOC IgM positivas.

**Tabela 3.29** Razões MMPs/TIMPs em LCR e soro e LCR/soro de MMPs, TIMPs e CAMs em doentes de EM *versus* BOC IgG e IgM positivas e negativas

	BOC IgG		BOC IgM	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
<b>MMP-9/TIMP-1 LCR</b>	0,012±0,002	0,005±0,002	0,009±0,002	0,010±0,001
<b>MMP-9/TIMP-1 soro</b>	5,02±0,50	5,41±0,89	3,91±0,92	5,60±0,61
<b>MMP-2/TIMP-2 LCR</b>	0,77±0,024	0,67±0,042	0,78±0,098	0,75±0,026
<b>MMP-2/TIMP-2 soro</b>	3,02±0,12	4,54±1,42	3,61±0,50	3,07±0,17
<b>LCR/soro</b>				
<b>MMP-9</b>	0,64±0,13*	0,17±0,03	0,63±0,32	0,49±0,12
<b>MMP-2</b>	136,85±13,63	100,37±28,49	156,96±88,23	131,60±12,05
<b>TIMP-1</b>	218,51±14,67	264,58±144,55	185,04±43,25	231,012±18,60
<b>TIMP-2</b>	520,10±35,71	565,88±40,08	358,41±87,29	554,29±38,08
<b>sICAM-1</b>	7,62±0,61*	13,12±1,95	9,21±3,08	8,27±0,68
<b>sVCAM-1</b>	22,92±2,13	22,33±6,55	36,97±13,97	22,16±1,78
<b>sE-Seletina</b>	5,74±0,97	0,89±0,12	6,74±3,44	4,23±0,75

BOC IgG- bandas oligoclonais IgG; BOC IgM- bandas oligoclonais IgM; LCR- líquido cefalorraquídeo; MMP-9;-2 metaloproteinase da matriz-9;-2; TIMP-1;-2- inibidor tecidual da MMP-9;-2; sICAM-1-*soluble intercelular adhesion molecule-1*; sVCAM-1- *soluble vascular cell adhesion molecule-1*; sE-seletina- *soluble E-selectin*. Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão e, as razões LCR/soro multiplicadas por 1000. O teste estatístico utilizado foi U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  vs BOC IgG negativas.

### 3.3 Polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9

#### 3.3.1 Caracterização da amostra

O estudo do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 foi efetuado num total de 355 indivíduos caucasianos, portugueses (169 doentes de EM e 186 controlos saudáveis), que representavam uma população homogénea e geneticamente estável. A caracterização demográfica e clínica dos doentes e controlos saudáveis (CS) apresenta-se na Tabela 3.30. Relativamente às variáveis idade e sexo não se registaram diferenças significativas entre os grupos, sendo a relação mulher/homem no grupo de doentes de 2,52. Na altura da colheita de sangue, os doentes de EM apresentavam uma duração média da doença de  $11,84 \pm 8,35$  anos, com um mínimo de 2 anos e um máximo de 43 anos, um valor médio de EDSS de  $2,95 \pm 1,82$ , encontrando-se divididos nos seguintes subtipos clínicos: 143 EMSR, 20 EMSP e 6 EMPP. Todos os doentes de EM tinham sido submetidos a terapêutica de primeira linha (59,7%; IFN ou GA) ou terapêutica de segunda linha (40,3%; fingolimod ou natalizumab), sendo que 60% dos doentes faziam terapia com IFN, no momento da colheita de sangue.

#### 3.3.2 Distribuição do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9

A distribuição do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 não revelou diferenças significativas entre os doentes de EM e os controlos saudáveis ( $p=0,971$ ), nem apresentou desvios ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg* em qualquer dos grupos, ver Tabela 3.31. O genótipo CC estava presente em 77 e 78% dos doentes e controlos, respetivamente, e apenas 2% dos doentes e CS eram homozigóticos para o alelo T. Quanto à frequência alélica, o alelo T apresentava uma frequência de 12,7% nos doentes e 12,1% nos controlos saudáveis, também sem diferenças significativas ( $p=0,839$ ; OR = 1,056; 95% CI = 0,640-1,732).

**Tabela 3.30** ó Caracterização demográfica e clínica dos doentes de EM e controlos saudáveis

	<b>EM</b> <b>n=169</b>	<b>CS</b> <b>n=186</b>
<b>Idade; anos</b> <sup>a</sup>	41,44±10,86	39,09±13,14
<b>(min-máx)</b>	(17-69)	(20-74)
<b>Sexo (F/M)</b> <sup>b</sup>	121/48	122/64
<b>(F/M) %</b>	(71,59/28,41)	(65,59/34,41)
<b>Idade de início da EM; anos</b>	32,19±10,17	----
<b>(min-máx)</b>	(8-56)	
<b>Duração da EM total; anos</b>	11,84±8,35	----
<b>(min-máx)</b>	(2-43)	
<b>Subtipos</b>	143 EMSR; 20 EMSP; 6 EMPP	----
<b>EDSS</b>	2,95±1,82	----
<b>(min-máx)</b>	(0,0-8,0)	

EM- esclerose múltipla; CS- controlos saudáveis; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram: <sup>a</sup>t-Student; <sup>b</sup> <sup>2</sup> de Pearson.

**Tabela 3.31** ó Distribuição do genótipo do polimorfismo -1562 C/T nos doentes e controlos

<b>-1562 C/T</b>	<b>EM</b>	<b>CS</b>
<b>MMP-9</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>CC</b>	130 (76,9)	145 (77,9)
<b>CT</b>	35 (20,7)	37 (19,9)
<b>TT</b>	4 (2,4)	4 (2,2)

EM- esclerose múltipla; CS- controlos saudáveis; MMP-9- metaloproteinase da matriz-9. O teste estatístico utilizado foi o <sup>2</sup> de Pearson.

De seguida procedeu-se à avaliação do polimorfismo -1562 C/T nos doentes e controlos de acordo com o género. Como a frequência do genótipo TT é muito baixa (apenas quatro casos em ambos os grupos), os portadores do alelo T (CT+TT) foram agrupados (Tabela 3.32). Nos controlos saudáveis tanto o genótipo como as frequências alélicas não

mostraram diferenças entre os indivíduos do sexo feminino e masculino. No entanto, nos doentes de EM, as mulheres apresentaram maior frequência do alelo T (15,7% sexo feminino *versus* 5,2% sexo masculino;  $p=0,040$ ) e do genótipo CT+TT (28,1% sexo feminino *versus* 10,4% sexo masculino;  $p=0,014$ ). De salientar que nenhum dos doentes de EM do sexo masculino era homozigótico para o alelo T, enquanto nos controlos saudáveis, dos quatro casos de genótipo TT, um era do sexo masculino.

**Tabela 3.32** 6 Distribuição do genótipo do polimorfismo -1562 C/T em doentes e controlos saudáveis, por sexo

<b>-1562 C/T</b>		<b>EM</b>	<b>CS</b>
<b>MMP-9</b>	<b>Genótipo</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	CC	87 (71,9)	98 (80,3)
<b>Feminino</b>	CT+TT	<b>34 (28,1)*</b>	24 (19,7)
<b>Sexo</b>	CC	43 (89,6)	47 (73,4)
<b>Masculino</b>	CT+TT	<b>5 (10,4)</b>	17 (26,6)

EM- esclerose múltipla; CS- controlos saudáveis; MMP-9- metaloproteinase da matriz-9. O teste estatístico utilizado foi o  $\chi^2$  de Pearson. \*  $p < 0,05$  sexo feminino *vs.* sexo masculino nos doentes.

### 3.3.2.a Polimorfismo -1562 C/T e curso da EM

Seguidamente investigou-se a possível influência do polimorfismo -1562 C/T no curso clínico da doença. A Tabela 3.33 representa as características dos doentes de EM de acordo com o estado de portador do alelo T (genótipo CC *versus* CT+TT). Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para nenhum dos parâmetros analisados. A idade média de início da EM foi de 32 anos, para ambos os genótipos, sendo a média da duração total da doença também comparável entre os dois grupos. O grau de incapacidade evidenciado na última avaliação foi ligeiramente superior no grupo com genótipo CC, em relação ao grupo portador do alelo T, estando também associado a uma percentagem ligeiramente superior de formas clinicamente progressivas (17,3 % *vs.* 10,3%), mas sem significado estatístico. Relativamente à terapêutica administrada, registou-se um equilíbrio na percentagem de doentes distribuídos pelas terapias de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> linha em ambos os grupos.

**Tabela 3.33** 6 Relação do polimorfismo -1562 C/T com os fatores clínicos, em doentes de EM

	<b>CC</b> <b>n=130</b>	<b>CT+TT</b> <b>n=39</b>
<b>Idade de início da EM; anos</b> <sup>a</sup>	32,07±10,05	32,59±10,67
<b>(min-máx)</b>	(8-56)	(17-54)
<b>Duração total da EM; anos</b> <sup>a</sup>	12,07±8,38	10,90±8,26
<b>(min-máx)</b>	(2-43)	(2-40)
<b>EDSS</b> <sup>a</sup>	3,05±1,89	2,62±1,54
<b>(min-máx)</b>	(0,0-8,0)	(0,0-7,5)
<b>Sintomas iniciais</b> <sup>b</sup>		
<b>(vias óticas/outras) %</b>	(22/78)	(12/88)
<b>Subtipos</b> <sup>b</sup>	107 EMSR; 18 EMSP; 5 EMPP	35 EMSR; 3 EMSP; 1 EMPP
<b>Conversão EMSR-EMSP</b> <sup>b</sup>		
<b>(Sim/Não) %</b>	(18/82)	(8/92)
<b>Terapia</b> <sup>b</sup>		
<b>(1ª linha/2ª linha)</b>	(50/50)	(47/53)

EM- esclerose múltipla; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. Os testes estatísticos utilizados foram: <sup>a</sup>t-Student; <sup>b</sup>  $\chi^2$  de Pearson.

Para explorar melhor esta possível associação, aplicou-se um modelo de regressão logística para avaliar a contribuição das diferentes variáveis demográficas e clínicas como preditivas do polimorfismo -1562 C/T (Tabela 3.34). Nenhuma das variáveis clínicas testadas (idade, idade de início da doença, duração da doença, sintomas iniciais, EDSS e tratamento) foi preditor independentemente da presença do alelo T. De facto, a única variável que mostrou uma associação com o polimorfismo foi, novamente, o género ( $p=0,049$ ).

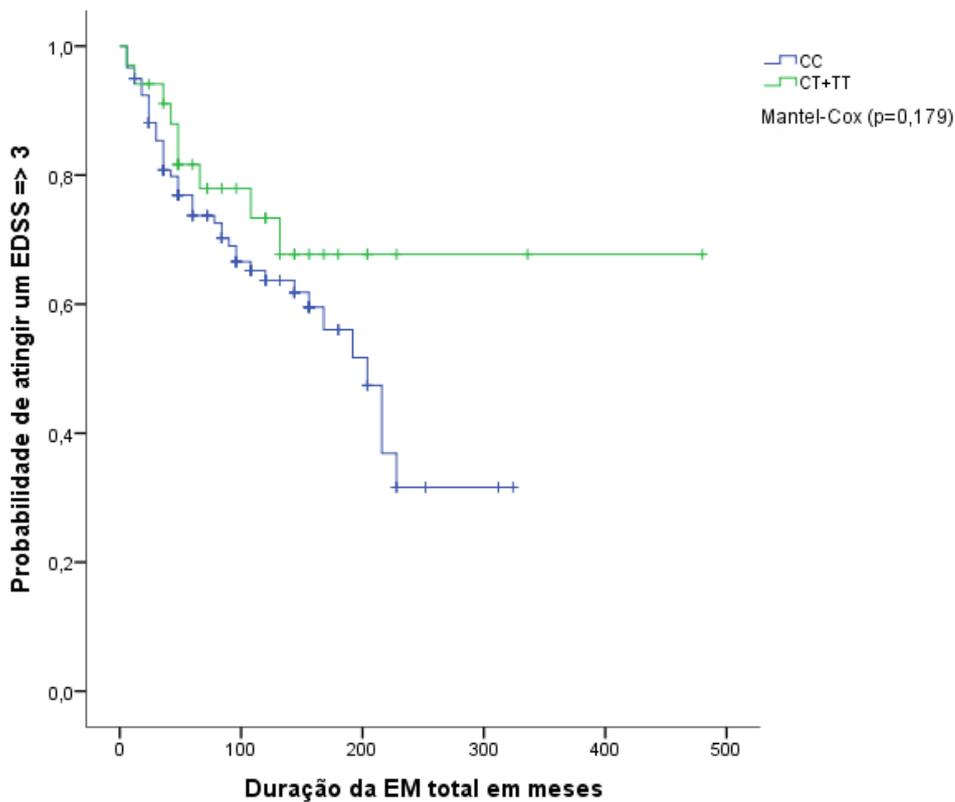
Seguidamente efetuou-se uma análise de sobrevivência para avaliar a influência do polimorfismo -1562 C/T na probabilidade de se atingir um valor de EDSS igual ou superior a 3, ao longo da doença, sabendo-se que um EDSS de 3 foi definido como incapacidade moderada. As curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier correspondentes encontram-se representadas na Figura 3.12. Assim, 38% dos doentes não portadores do alelo T e 26% dos portadores do alelo T atingiram um EDSS  $\times$  3 durante o curso da

doença, não se registando diferenças significativas no tempo médio estimado para atingir este *score* de gravidade (genótipo CC =  $184 \pm 15$  meses; genótipo CT+TT =  $346 \pm 38$  meses;  $2(1) = 1,804$ ;  $p=0,179$ ).

**Tabela 3.34** ó Variáveis testadas como preditivas do polimorfismo -1562 C/T

Variáveis independentes	Regressão logística binária	
	Odds ratio (IC 95%)	p-value
Idade	1,034 (0,903-1,185)	0,627
Sexo	3,867 (1,003-14,908)	<b>0,049</b>
Idade de início da EM	0,981 (0,858-1,122)	0,781
Duração da EM	0,982 (0,833-1,158)	0,830
Sintomas iniciais	2,733 (0,676-11,047)	0,158
EDSS	0,880 (0,559-1,385)	0,581
Terapêutica	1,708 (0,547-5,330)	0,356

IC- intervalo de confiança a 95%; EM-esclerose múltipla; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. A análise estatística usada foi o modelo de regressão logística binária.



**Figura 3.12** ó Probabilidade de atingir um valor de EDSS  $\times 3$  em doentes de EM portadores do polimorfismo -1562 C/T. EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; EM- esclerose múltipla.

### 3.3.3 Avaliação da concentração sérica de MMP-9 em função do genótipo e curso clínico da EM

A concentração sérica da MMP-9 foi determinada num subgrupo desta população em estudo, constituído por 96 doentes de EM e 63 controlos saudáveis. Neste subgrupo, os doentes eram ligeiramente mais velhos comparativamente aos controlos ( $p=0,043$ ), mas na distribuição por género não se verificaram diferenças significativas. A Tabela 3.35 apresenta as características demográficas e clínicas do grupo de doentes de EM, sendo as particularidades clínicas semelhantes, comparativamente aos doentes da população total (descrita na Tabela 3.30). Como esperado, a concentração média da MMP-9 no soro foi mais elevada em doentes de EM do que nos CS ( $p < 0,001$ ).

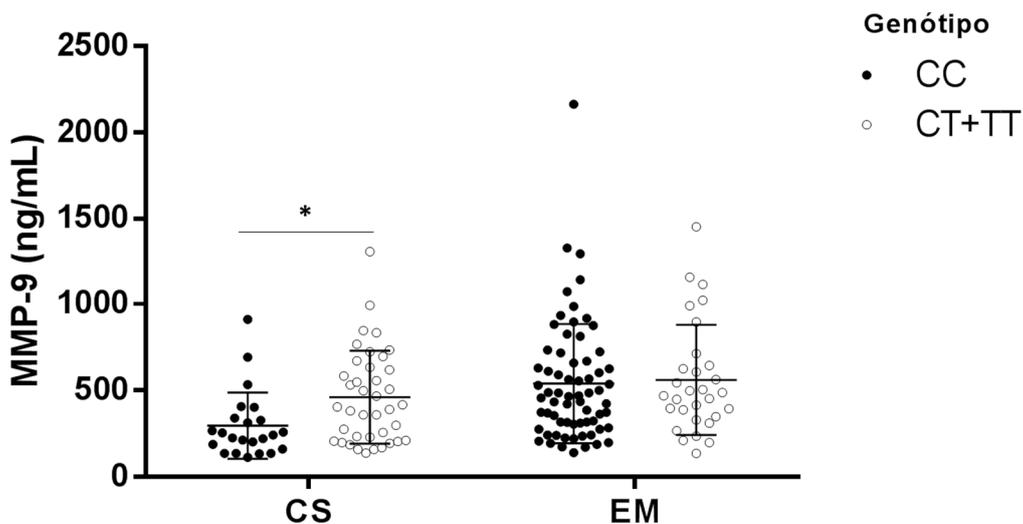
**Tabela 3.35** 6 Caracterização demográfica, clínica e concentração sérica da MMP-9 nos doentes de EM e controlos saudáveis

	<b>EM</b> <b>n=96</b>	<b>CS</b> <b>n=63</b>	<b><i>p-value</i></b>
<b>Idade; anos</b> <sup>a</sup>	43,92±11,20	39,79±14,09	0,043
(min-máx)	(18-69)	(20-74)	
<b>Sexo (F/M)</b> <sup>b</sup>	74/22	43/20	0,217
<b>Idade de início da EM; anos</b>	32,62±10,67	----	----
(min-máx)	(8-56)		
<b>Duração total da EM; anos</b>	14,07±8,75	----	----
(min-máx)	(2-43)		
<b>Subtipos</b>	75 EMSR; 17 EMSP; 4 EMPP	----	----
<b>EDSS</b>	3,56±1,94	----	----
(min-máx)	(1,0-8,0)		
<b>MMP-9; ng/mL</b> <sup>a</sup>	545,19±337,20	401,10±252,54	<0,001

EM- esclerose múltipla; CS- controlos saudáveis; F/M- feminino/masculino; EMSR- esclerose múltipla surto-remissão; EMSP-esclerose múltipla secundária progressiva; EMPP- esclerose múltipla primária progressiva; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*. Os resultados são apresentados na forma de média±desvio padrão. <sup>a</sup>t-Student; <sup>b</sup> 2 de Pearson.

De seguida avaliou-se a influência do polimorfismo -1562 C/T nos níveis séricos de MMP-9 em cada um dos grupos de diagnóstico. Como representando na Figura 3.13, nos doentes de EM, a concentração sérica da MMP-9 não foi influenciada pela presença do

alelo T, enquanto nos controlos saudáveis, a presença do alelo T estava associada ao aumento da concentração da MMP-9 no soro ( $p=0,008$ ). A análise de ANOVA fatorial mostrou um forte efeito no diagnóstico ( $p=0,001$ ) e uma tendência para um efeito do genótipo nos níveis de soro da MMP-9 ( $p=0,079$ ), sem interação entre estes dois fatores ( $p=0,178$ ). Os níveis da MMP-9 no soro de doentes de EM, também não foram influenciados pelo sexo observando-se uma concentração média no sexo feminino de  $536,9\pm306,0$  ng/mL e no sexo masculino de  $573,0\pm433,3$  ng/mL ( $p=0,993$ ).

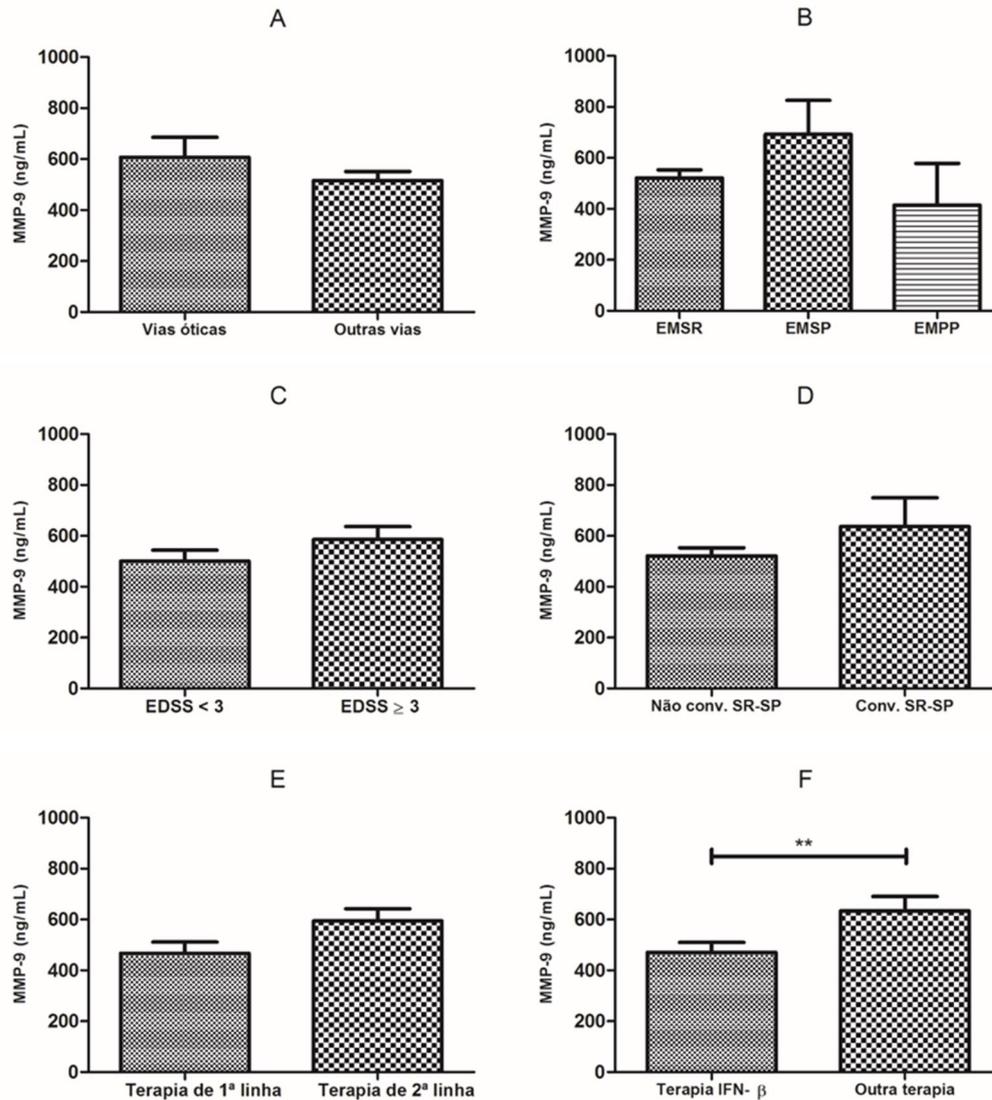


**Figura 3.13** Representação gráfica da distribuição no subgrupo de 159 amostras (96 doentes de EM; 63 controlos saudáveis), segundo a concentração de MMP-9 e os genótipos (CC; CT+TT). As linhas horizontais correspondem à concentração média±desvio padrão em controlos saudáveis (CS) e doentes (EM). O teste estatístico aplicado foi o U de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

Para explorar a eventual relação entre a concentração da MMP-9 com o curso clínico da EM, calcularam-se os valores médios de MMP-9 no soro em função dos primeiros sintomas manifestados pelos doentes (A); dos subtipos clínicos (B); do grau de incapacidade com base no *score* de EDSS < 3 vs.  $\times 3$  (C); da conversão para formas progressivas (D) e o tipo de terapêutica administrada (E e F) (Figura 3.14). Não se registaram diferenças significativas nos níveis de MMP-9 no soro associadas aos sintomas iniciais, subtipos clínicos, conversão de EMSR para EMSP ou severidade da doença. Verificou-se porém, uma redução significativa na concentração sérica da MMP-9 em doentes a realizar atualmente terapia com IFN (terapia com IFN =  $470\pm39$  ng/mL vs. sem terapia com IFN =  $634\pm57$  ng/mL;  $p=0,009$ ), bem como, uma tendência para uma associação entre uma concentração mais elevada da MMP-9 com a necessidade de

terapia de segunda linha (doentes submetidos à terapia de segunda linha =  $594 \pm 36$  ng/mL versus doentes submetidos apenas a terapia de primeira linha =  $466 \pm 79$  ng/mL;  $p=0,053$ ).

Procedeu-se a uma análise da correlação de Pearson entre os níveis séricos de MMP-9, a idade, idade de início da doença, a duração da doença e o EDSS, não se observando qualquer correlação significativa (não mostrado).



**Figura 3.14** Concentração sérica da MMP-9 determinada no subgrupo de doentes de EM relativamente às variáveis clínicas. n=96: A- sintomas iniciais (vias óticas n=15; outras vias n=66); B- subtipos (EMSR n=75; EMSP n=17; EMPP n=4); C- EDSS <3 (n=45); EDSS ≥3 (n=51); D- Conversão de EMSR para EMSP (Não conversão n=76; Conversão n=20); E- Terapia (1ª linha n=37; 2ª linha n=59); F- Terapêutica (com IFN-β n=52; outra n=44). Os resultados são apresentados na forma de média±erro padrão. O teste estatístico aplicado foi o U de Mann-Whitney. \*\* $p < 0,01$ .



## **4 Discussão**

### **4.1 Considerações gerais**

A EM é conhecida como uma patologia multifatorial que afeta um elevado número de indivíduos e é a maior causa de incapacidade em adultos jovens. Apesar da sua natureza idiopática, várias evidências sugerem que a etiologia da doença implica uma associação entre o meio ambiente, a predisposição genética e o sistema imune (Mallucci et al. 2015). Na ausência de marcadores específicos da EM, diferentes critérios de diagnóstico clínico têm sido utilizados, sendo a presença de bandas oligoclonais do tipo IgG no LCR, um dos testes paraclínicos relevantes para o diagnóstico da doença (Poser et al. 1983; Andersson et al. 1994; McDonald et al. 2001). A marcada heterogeneidade no curso da doença, provavelmente refletindo mecanismos imunopatológicos distintos (Lucchinetti et al. 2000), condiciona fortemente o diagnóstico da EM, que se pretende que seja o mais precoce possível, de modo a permitir a instituição de uma terapêutica que permita reduzir a atividade da EM e atrasar a progressão da incapacidade da doença (Jacobs et al. 2000; Comi et al. 2001b).

O principal objetivo deste trabalho foi encontrar marcadores biológicos que pudessem funcionar como indicadores de prognóstico na esclerose múltipla. Relativamente aos marcadores biológicos avaliados, centrámo-nos em marcadores de disrupção da barreira hematoencefálica e em marcadores de ativação intratecal de células B, as bandas oligoclonais. Inicialmente (secção 3.1), começámos por avaliar o potencial das bandas oligoclonais IgG, efetuadas por rotina no laboratório de Neuroquímica para efeitos de diagnóstico, como indicadores de prognóstico. Tendo em conta os dados existentes na literatura, decidimos também avaliar na nossa população a utilidade das bandas oligoclonais do tipo IgM no prognóstico. Como marcadores de disfunção da BHE (secção 3.2), seleccionámos as MMPs, nomeadamente a MMP-2 e MMP-9 e os seus respetivos inibidores tecidulares, TIMP-1 e TIMP-2. Conhecendo a interação destas moléculas com a matriz extracelular e a fisiopatologia inflamatória da EM, considerámos ser relevante também investigar o papel dos recetores de adesão celular que existem na superfície endotelial e medeiam a invasão das células imunes. Por isso avaliámos também as formas solúveis das seguintes moléculas de adesão celular: ICAM-1, VCAM-1 e E-Selelina. De notar que estes marcadores incluem alguns dos alvos de determinadas abordagens

terapêuticas aprovadas para o tratamento da EM, por exemplo o natalizumab interage com as moléculas de adesão celular enquanto, o INF $\gamma$  atua ao nível da MMP-9. Finalmente, tendo em conta os resultados obtidos na secção 3.2, centrámo-nos na MMP-9 (secção 3.3) e estudámos o polimorfismo -1562 C/T do gene desta metaloproteinase, avaliando se este conferia suscetibilidade para a EM ou influenciava o curso clínico da doença.

O desenho dos dois primeiros estudos foi semelhante. A análise dos diferentes marcadores foi realizada em amostras emparelhadas de LCR e soro de doentes de EM, colhidas no momento da sua investigação diagnóstica, sendo que a população usada na secção 3.2 representa um subgrupo da população utilizada na secção 3.1. Numa primeira fase, os resultados obtidos nos doentes de EM foram comparados com dois grupos de controlos patológicos: doentes com outras patologias inflamatórias do SNC (mielite, vasculite, nevrite ótica, doença de *Behçet* e outras) e doentes com várias patologias não inflamatórias do SNC (neuropatia ótica isquémica anterior, hipertensão intracraniana, doença vascular cerebral, neoplasia do SNC, entre outras) que fazem diagnóstico diferencial de EM. Numa segunda fase, de forma a avaliar o potencial prognóstico dos diferentes marcadores na EM, estes foram relacionados com indicadores clínicos da posterior progressão da doença. Contrariamente ao efetuado nalguns estudos, não avaliámos o valor de prognóstico dos marcadores biológicos selecionados relativamente à transição entre a forma CIS e CDMS, pois os doentes de EM envolvidos no nosso estudo apresentavam, já na altura da colheita da amostra, um tempo de duração da doença superior, em média, a 4 anos, tratando-se, na sua maioria de formas clinicamente definidas. De facto, apenas 19% dos doentes apresentavam uma duração da doença no momento da punção lombar inferior a um ano.

No terceiro estudo, a abordagem metodológica foi diferente. O trabalho envolveu doentes de EM e controlos saudáveis, aos quais foi efetuada uma colheita de sangue venoso, especificamente para o estudo. De notar que, no caso dos doentes de EM, a colheita da amostra não foi efetuada durante a avaliação diagnóstica, mas sim durante uma consulta de seguimento, apresentando portanto, os doentes uma duração média da doença de 11,8 anos e formas menos agressivas da doença. Tal como nos estudos anteriores, primeiro realizou-se uma avaliação comparativa dos resultados entre doentes e controlos saudáveis. Posteriormente, no grupo de doentes, relacionaram-se os resultados obtidos com fatores clínicos na tentativa de encontrar indicadores de prognóstico.

Como indicadores clínicos de progressão da doença usámos essencialmente o valor de EDSS. A escala de EDSS é habitualmente empregue como medida do resultado primário da deficiência e inabilidade neurológica em ensaios clínicos de EM. Apesar de ser uma medida subjetiva, fortemente condicionada pelos distúrbios motores, é a escala mais usada para quantificar o grau de incapacidade dos doentes de EM. No nosso estudo, o valor do EDSS foi usado como indicador de prognóstico numa avaliação com múltiplas vertentes: apreciação pontual numa data fixa (na data da colheita da amostra ou na data da última avaliação do doente para este estudo); ou em função da duração da doença (1, 3, 5 ou 10 anos após o início da EM). Também se selecionaram alguns pontos de corte nesta escala de EDSS que estão relacionados com marcos importantes de incapacidade dos doentes. Por exemplo, o ponto de corte para o valor de EDSS=3 caracteriza o doente de EM, como indicador de incapacidade moderada (Leray et al. 2010; Kerbrat et al. 2015), enquanto o valor de EDSS=4 corresponde a um marco importante na mobilidade do doente de EM, indicativo da capacidade de caminhar o equivalente a 500 m sem necessidade de ajuda ou descanso (Confavreux et al. 2000). Já um valor de EDSS=6 corresponde à necessidade de um apoio constante e unilateral ao doente de EM para caminhar 100 m (Kurtzke 1983). Para além da escala de EDSS, considerámos também outros indicadores de prognóstico como, o número e a taxa de surtos (nos doentes com formas SR), os subtipos clínicos e a conversão ou não do fenótipo EMSR para EMSP durante a evolução da doença. O tipo de terapêutica administrada foi também usado como um marcador de prognóstico, considerando que a necessidade de administração de fármacos de 2ª linha seria indicativa de um curso mais agressivo da doença.

Relativamente à população de doentes de EM usada nos dois primeiros estudos, podemos afirmar que as suas características demográficas à data da observação diagnóstica (idade média de 38 anos e predomínio do sexo feminino) estão em linha com os dados do estudo epidemiológico realizado por De Sá e colaboradores (De Sa et al. 2014). Este estudo mostrou uma incidência da doença entre os 35 e os 44 anos, numa população portuguesa localizada a norte de Lisboa, enquanto outros estudos apontam a faixa etária 20-40 anos como a mais comum para iniciar a doença (Zuvich et al. 2009; Iwanowski e Losy 2015). Apesar da razão mulher/homem nos nossos doentes de EM ser ligeiramente inferior à registada por De Sá et al., 2006, no distrito de Santarém (2,33 vs. 2,9) (De Sa et al. 2006), o nosso resultado é concordante com o intervalo definido para a maioria das populações (1,5 a 2,5) e publicado por (Orton et al. 2006), sabendo-se que há uma tendência para

razões crescentes em estudos mais atuais (Zuvich et al. 2009). Quanto às características clínicas da nossa população de doentes de EM, a distribuição pelos diferentes subtipos clínicos coincide com a de diversos outros trabalhos (Lublin e Reingold 1996; Hauser e Oksenberg 2006). No entanto, em comparação com outros estudos Portugueses encontram-se algumas diferenças, que podem muito provavelmente ser atribuídas à reduzida população utilizada nestes estudos (De Sa et al. 2006).

No que respeita ao terceiro estudo, apesar das diferenças a nível da fase da doença em que foi efetuada a colheita da amostra biológica, as características gerais do grupo dos doentes são semelhantes às descritas em cima. De referir contudo que neste estudo, no momento da colheita, todos os doentes faziam terapêutica de 1ª linha (IFN ou GA) ou de 2ª linha (fingolimod ou natalizumab), enquanto nos dois primeiros trabalhos nenhum doente estava ainda medicado com DMTs.

## **4.2 Bandas oligoclonais do tipo IgG**

A análise dos padrões de distribuição das bandas oligoclonais do tipo IgG por focagem isoelétrica, segundo a definição de Andersson e colaboradores (1994), revelou, como seria de esperar, diferenças significativas na distribuição dos vários padrões de IgG entre os doentes de EM e os grupos controlo. Observámos uma representação predominante do tipo 2, correspondendo à presença de BOC restritas ao LCR, nos doentes de EM, enquanto os grupos controlo apresentaram uma prevalência elevada do predomínio do tipo 1 ou ausência de BOC IgG no soro e LCR (ver Figura 3.1).

A positividade das BOC IgG no LCR dos nossos doentes de EM foi muito semelhante à descrita por Sá e colaboradores em 2005, na população portuguesa (Sa et al. 2005). Tendo em conta os dados relativos à percentagem dos doentes de EM com BOC IgG positivas a nível mundial, o nosso resultado (83,5%) está na linha do registado na maioria dos países Europeus (República Checa com 81% (Bednarova et al. 2005); Itália 85% (Ferraro et al. 2013), Turquia 86% (Idiman et al. 2009); França 87% (Becker et al. 2015); Espanha 88% (Falip et al. 2001; Villar et al. 2009)) e do continente Americano (Brasil 85% (Puccioni-Sohler et al. 1999), Canadá 89% (Siritho e Freedman 2009) e Estados Unidos 90% (Fortini et al. 2003)). No entanto, foi superior ao descrito nos trabalhos de Fukazawa e colaboradores, e de Kikuchi e coautores, 56,1% e 53,3%, respetivamente, detetados em populações japonesas (Fukazawa et al. 1998; Kikuchi et al. 2003), mas inferior aos dados

do Reino Unido e de alguns países escandinavos, na ordem dos 95-100% (McLean et al. 1990; Lunding et al. 2000).

As diferenças percentuais na positividade das bandas oligoclonais IgG nas várias investigações reflete muito provavelmente as diferentes metodologias utilizadas, tais como: eletroforese em gel de agarose, eletroforese em acetato de celulose, focagem isoelétrica em gel de agarose, seguida ou não de imunoblotagem, focagem isoelétrica em gel de poliacrilamida com imunofixação e coloração pela prata (Link e Huang 2006). De notar que o método mais sensível para a deteção de bandas oligoclonais no LCR é a FIE seguida de imunoblotagem e o menos recomendado a eletroforese (Link e Huang 2006). Também se sabe que nas patologias inflamatórias como a EM, ocorre a libertação de um número restrito de clones de células B no LCR e compartimentos do SNC, com posterior transformação em células secretoras de IgG e cada clone produz IgG com mobilidade altamente restrita na eletroforese (Link e Huang 2006). Além disso, acrescem as desigualdades na prevalência da EM relacionadas com a diferença de latitude. No entanto, os estudos apontam para que de facto exista uma tendência para uma diminuição da prevalência de BOC IgG no LCR em doentes de EM dos países do sul da Europa (apesar da metodologia usada na sua deteção ser a ideal) relativamente aos países escandinavos ou ao Reino Unido.

Nos nossos grupos controlo, o grupo de doentes com patologias inflamatórias do SNC registou uma percentagem de BOC IgG no LCR positivas de 20,5%, praticamente metade do observado no trabalho de Sá e coautores (40%) (Sa et al. 2005). No entanto, a composição do grupo não era análoga (doenças inflamatórias/infecciosas do sistema nervoso), sendo referidas meningite, encefalite e neuro-sífilis, como as três patologias mais frequentes (Sa et al. 2005). Em conformidade com a literatura, a composição dos grupos controlo para as doenças inflamatórias é muito variável e consequentemente a percentagem de positividade das BOC IgG. Por exemplo, um estudo realizado em 68 doentes com neuroborreliose revelou uma presença de BOC IgG em 47% dos casos (Schwenkenbecher et al. 2017), enquanto nos casos de mielite, uma das patologias incluída no nosso grupo controlo, a positividade de BOC IgG variou de 71% (Contentti et al. 2017) a 38% (Bourre et al. 2012). Os nossos resultados registaram no grupo das doenças não inflamatórias do SNC 10,8%, de BOC IgG positivas, em oposição a 3,5% no trabalho de Sá e colaboradores, onde os tipos de doenças mais frequentes eram patologia isquémica cerebrovascular, doença neurodegenerativa e mielopatia

espondilítica (Sa et al. 2005). De referir também que neste trabalho, realizado na zona Norte do país, o tamanho dos grupos de outras doenças inflamatórias e não inflamatórias era bastante superior ao nosso (141 e 173 casos, respetivamente). Segundo Sá e coautores, a baixa percentagem de positividade atribuída a este grupo das doenças não inflamatórias, poderá estar associada à sua composição, uma vez que a positividade das BOC IgG na doença neurodegenerativa é geralmente bastante baixa. Um trabalho sobre demências neurodegenerativas realizado num total de 131 doentes mostrou uma presença de BOC IgG em 7% (Janssen et al. 2004). Enquanto outro com 765 doentes revelou apenas 5 casos de BOC IgG positivas (Jesse et al. 2011). Comparativamente aos outros estudos internacionais atrás referidos, em que a maioria usa como grupo controlo outras doenças neurológicas consideradas não inflamatórias, também o valor da positividade das BOC IgG no LCR ronda os 7 a 9% (Kostulas et al. 1987; McLean et al. 1990; Lunding et al. 2000; Bednarova et al. 2005). Em adição, importa salientar o valor das BOC IgG como apoio paraclínico ao diagnóstico da EM, onde a nossa análise revelou que a presença de bandas estava associada a um risco acrescido de doença de 27,2, com uma variação entre 13,1-56,5. Este valor está de acordo com o descrito por Bourre e colaboradores, que reportaram um risco acrescido de 15,76, com uma variação de 2,95 a 84,24 (Bourre et al. 2012), ou com o de Leone e coautores (Leone et al. 2008), que apresentou um OR de 17,2, com um intervalo de variação de 2,2-136,4. Também um estudo de meta-análise revelou um risco estimado de 34,2 com uma variação entre 2,75-171 (Skov et al. 2010).

Seguidamente, investigámos sobre a possível influência das bandas oligoclonais IgG no LCR na apresentação da EM. Para tal, dividimos o grupo de EM em doentes com e sem bandas oligoclonais IgG e comparámos as características demográficas e clínicas destes dois grupos no momento de colheita da amostra. A idade na PL revelou-se estatisticamente menor no grupo BOC IgG positivas (36,8 anos), em comparação com o grupo das BOC IgG negativas (42,4 anos), o que está em linha com um estudo realizado na Grécia em 231 doentes (53,2% CDMS e 46,8% CIS), com um registo significativo de BOC IgG positivas em doentes mais jovens que os sem BOC IgG ( $35,2 \pm 10,3$  vs.  $38,7 \pm 11,8$  anos) (Andreadou et al. 2013). Observámos também uma duração da EM até à punção lombar, significativamente inferior no grupo IgG positivas, em oposição ao estudo realizado por Siritho e Freedman no Canadá, que não registou diferenças (Siritho e Freedman 2009). Este dado parece sugerir que, apesar do EDSS na punção lombar ser semelhante, os doentes com BOC IgG negativas só fazem PL muito mais tarde, em

comparação com os doentes com BOC IgG positivas (8,2 vs. 3,5 anos). Isto poderá significar que, pelo menos numa fase inicial da doença, a ausência de BOC IgG, ou seja, uma menor inflamação no SNC, será benéfica, pois os doentes não sentem necessidade de procurar o neurologista. Por outro lado, uma possível explicação para o facto poderá ser simplesmente a organização do sistema de saúde, a geoe epidemiologia, ou ainda, a baixa incidência de doentes com BOC IgG negativas, cerca de 10%. Também ao nível das primeiras manifestações clínicas, os nossos doentes de EM do grupo BOC IgG positivas apresentaram maior percentagem significativa nos sintomas ao nível da via supratentorial, contradizendo de novo os achados de Siritho e Freedman, onde os doentes com BOC IgG negativas mostraram uma tendência para um envolvimento supratentorial com maior localização inicial, ainda que inespecífica (Siritho e Freedman 2009). De acordo com estes investigadores uma apresentação mais difusa da doença poderá relacionar-se com a tendência para os doentes com BOC IgG negativas ocultarem uma evolução mais progressiva da EM (Siritho e Freedman 2009).

#### **4.2.1 Bandas oligoclonais IgG *versus* progressão da EM**

No sentido de avaliar o valor de prognóstico das bandas oligoclonais IgG, fomos comparar a evolução da doença pós PL em doentes de EM com e sem bandas. Para estimar a severidade da doença ao longo do tempo, comparámos o valor médio de EDSS em vários momentos distintos: 1 ano após o início da EM, passados 3, 5 e 10 anos e num momento superior a 10 anos após o início da doença. Na primeira avaliação, ao fim do primeiro ano de doença, o EDSS foi significativamente mais elevado no grupo de doentes com BOC IgG positivas, em relação aos doentes de EM sem BOC IgG. Todavia, no curso da doença, o sentido desta diferença alterou-se, passando, no momento superior a 10 anos da doença, o EDSS a atingir valores significativamente mais elevados no grupo de doentes com BOC IgG negativas. O valor crescente do EDSS sugere um acréscimo de incapacidade com a evolução da EM, com uma progressão constante associada à ausência de BOC IgG. De acordo com este resultado, também os valores médios de EDSS atual, referentes à última avaliação do estudo, se revelaram significativamente aumentados nos doentes com BOC IgG negativas (ver Figura 3.3). Do mesmo modo, verificámos que os doentes sem BOC IgG tinham maior probabilidade de atingir um EDSS igual ou superior a 4 ao fim de 10 anos após o início da EM, do que os que apresentavam BOC IgG restritas ao LCR. Os doentes sem BOC IgG atingiram também com mais frequência um EDSS

igual a 6 nalgum momento no curso da doença do que os doentes com BOC IgG. No entanto, na análise de sobrevivência não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o tempo estimado para atingir um EDSS de 4 nos doentes com e sem bandas IgG. De notar, que existe um desequilíbrio acentuado entre o número de doentes de EM com e sem bandas IgG (152 vs. 31), e portanto a análise deste tipo de curvas poderá estar condicionada por este desequilíbrio.

Em suma, estes resultados de associação entre a presença de BOC IgG e os valores de EDSS ao longo do curso da doença sugerem que a ausência de BOC IgG, apesar de numa fase inicial poder ser um indicador de menor severidade da doença, estará associada a uma maior agressividade a longo prazo, manifestada pelo aumento de incapacidade dos doentes. A relação da presença de BOC IgG e a progressão de incapacidade na EM continua a ser alvo de alguma controvérsia em função das diferentes investigações, que apresentam tempos de seguimento muito variáveis. Vários estudos defendem que a ausência de BOC IgG parece apontar para uma evolução mais favorável, reportando baixos índices de progressão (Zeman et al. 1996; Sa et al. 2005). Nestes trabalhos o número de doentes de EM foi de 290 e 92 para Zeman e Sá, respetivamente, o seguimento foi inferior a 5 anos, e a escala de EDSS não foi explorada no sentido de avaliar a evolução da incapacidade do doente em função do tempo. Os autores aconselharam mesmo, uma reavaliação dos doentes na pesquisa de bandas oligoclonais no LCR (Zeman et al. 1996; Sa et al. 2005). Noutro trabalho envolvendo 209 doentes de subtipo EMSR, a ausência de BOC IgG no LCR, detetada em 10,5% dos doentes, foi associada a um atraso na progressão da incapacidade (Annunziata et al. 2006), enquanto o estudo de Joseph e colaboradores indica que a ausência de BOC IgG diminui o risco de progressão da doença (Joseph et al. 2009). O trabalho dos investigadores Siritho e Freedman apoia parcialmente a hipótese benéfica da ausência de bandas IgG no LCR, uma vez que a síntese intratecal de IgG desenvolve surtos mais rapidamente e manifesta um quadro de inflamação mais aguda, especialmente nas formas EMSR. Contudo, concluem no seu trabalho que a inexistência de bandas não confere um curso de doença mais benigno (Siritho e Freedman 2009). Também os trabalhos mais recentes realizados em dois centros Franceses, envolvendo cada um deles mais de 400 doentes de EM, não parecem apontar para a presença de BOC IgG como um fator de prognóstico na progressão da doença (Becker et al. 2015; Moroso et al. 2015). Em oposição ao exposto, e de acordo com os nossos resultados, a investigação de Idiman e colaboradores, 2009, realizada em 210 doentes de

EM, mostrou que, num espaço de 5 anos foi possível alterar a aparente melhoria manifestada com a ausência de BOC IgG no LCR, apresentando um aumento dos valores de EDSS ao longo do tempo significativamente superior (Idiman et al. 2009).

Os fenótipos clínicos que se desenvolvem no curso da doença também refletem progressão da EM. No nosso trabalho, a positividade das BOC IgG registou diferenças significativas entre os diferentes fenótipos de EM, com os doentes de EMPP a registarem uma percentagem mais baixa de BOC IgG positivas que os outros dois grupos (61% vs. 86% - EMSR e 89% - EMSP). Os nossos resultados confirmam o trabalho apresentado por Villar e coautores (2009), em que a percentagem de doentes com BOC IgG positivas era muito mais baixa nos doentes com formas primárias progressivas (36%; n=39) do que nos restantes subtipos (88% em ambos; EMSR n=360; EMSP n=25) (Villar et al. 2009). Esta diminuição da percentagem no fenótipo EMPP poderá estar associada ao sexo, uma vez que no estudo de Villar e colaboradores se verificou um predomínio do sexo masculino no subgrupo de EMPP (21 homens e 18 mulheres). Porém, os nossos resultados apresentaram uma distribuição distinta com o predomínio do sexo feminino também nas formas PP.

Este resultado, dos doentes com EMPP registarem uma percentagem mais baixa de BOC IgG positivas, está muito provavelmente relacionado com o nosso resultado anterior da ausência de BOC IgG estar associada a uma maior incapacidade dos doentes. De facto, observámos que, os nossos doentes com EMPP e BOC IgG negativas praticamente todos pertencem ao grupo de doentes que atingem um EDSS  $\times$ 6 no curso da EM. O que está de acordo com a ideia de que as formas PP estão naturalmente associadas a um menor componente inflamatório e a um maior componente neurodegenerativo.

No nosso trabalho também fomos relacionar a presença de BOC IgG com o tipo de terapia administrada aos doentes (1ª linha vs. 2ª linha). Observámos que aos doentes sem BOC IgG foi administrada terapêutica de 2ª linha com significativamente mais frequência do que aos doentes com bandas oligoclonais positivas. A necessidade de medicação de 2ª linha, certamente está relacionada com o aumento de incapacidade manifestada pelo doente em consequência de uma evolução menos favorável da EM, e portanto aponta para um pior prognóstico.

Assim, parece-nos poder concluir que, nos doentes com esclerose múltipla, para além do já reconhecido valor no apoio ao diagnóstico clínico, as BOC IgG no LCR parecem ter

também efeito preditivo na evolução da EM, estando associadas a um pior prognóstico a longo prazo. Certamente, estudos mais robustos, com um seguimento mais longo e rigoroso, poderão ajudar a corroborar estes resultados e a clarificar a aparente discrepância entre o prognóstico a curto e longo prazo.

### **4.3 Bandas oligoclonais do tipo IgM**

Na avaliação das bandas oligoclonais do tipo IgM por FIE e de acordo com a descrição de Villar (Villar et al. 2001), os nossos resultados mostraram que o padrão de  $\delta$ BOC IgM restritas ao LCR estava presente em apenas 16,5% dos doentes de EM e nos grupos controlo em 6,3% nos doentes com outras doenças inflamatórias e 5,4% nos doentes com doenças não inflamatórias do SNC, sem diferenças significativas entre os grupos. De facto, o padrão mais representativo nos 3 grupos em estudo foi o de ausência de BOC IgM no LCR e no soro (ver Figura 3.2). Esta percentagem de doentes de EM com BOC IgM positivas é bastante semelhante à registada por Ferraro e colaboradores, numa população italiana com um total de 205 doentes, que reportaram uma percentagem total de positividade de BOC IgM de 19% (Ferraro et al. 2013). Esta percentagem é no entanto inferior à indicada nos estudos do grupo espanhol. Estes autores começaram por reportar nos seus estudos iniciais, com um número relativamente pequeno de doentes de EM, uma percentagem à volta de 40% de BOC IgM positivas (Villar et al. 2002a; Villar et al. 2003), que depois, em estudos com um tamanho amostral maior e envolvendo diferentes populações (Espanha e Suécia), baixou para valores ligeiramente inferiores aos 30% (Villar et al. 2009). De acordo com estes estudos, também um outro grupo italiano investigou a síntese intratecal de IgM numa população de 149 doentes de EM (45 EMPP, 69 EMSR, 35 EMSP), observando uma positividade de 36,2% (Sola et al. 2011). Tendo em conta que a metodologia aplicada nestes estudos (Villar et al. 2001) foi semelhante à nossa, parece-nos ser importante continuar a investigar se a aparente reduzida percentagem de doentes de EM com BOC IgM positivas na nossa população se pode dever a algum enviesamento na seleção da amostra. É possível que neste centro Espanhol a punção lombar seja efetuada aos doentes com suspeita de diagnóstico de EM de uma forma rotineira. Em contrapartida, em Portugal, situações de diagnóstico mais complexo, com resultados discrepantes entre a clínica e a imagem (RM), ou casos mais atípicos, em que os achados imagiológicos não são conclusivos em demonstrar o carácter inflamatório

das lesões, serão submetidos a PL. Desta forma, é possível que a nossa amostra de doentes de EM não seja representativa da generalidade dos doentes, o que poderá contribuir para a reduzida percentagem de BOC IgM positivas.

Analisando em simultâneo a presença de BOC IgM e IgG observámos que dos 19 doentes de EM com BOC IgM positivas, 16 (84,2%) eram igualmente positivos para BOC IgG e 3 eram negativos. Curiosamente, um outro estudo que avaliou simultaneamente a presença de BOC IgG e IgM, revelou que, todos os doentes de EM com BOC IgM positivas (n=11) eram igualmente positivos para BOC IgG (Villar et al. 2003).

Como referido anteriormente, no nosso estudo, 6,3% dos doentes com outras doenças inflamatórias e 5,4% com doenças não inflamatórias do SNC apresentaram BOC IgM positivas. Este resultado também apresenta algumas diferenças ao previamente reportado por Villar e colaboradores, que pesquisaram a presença de BOC IgM em quatro grupos controlo: doentes com infeções do SNC (n=28), doentes com outras doenças neurológicas inflamatórias (n=17), doentes com doenças neurológicas não inflamatórias (n=15) e doentes com dor de cabeça não específica (n=8) (Villar et al. 2002a). Estes autores detetaram BOC IgM positivas em 71,4% dos doentes com infeções do SNC. Nos restantes três grupos a síntese intratecal de IgM foi negativa, ou seja com uma percentagem de 0%.

Em continuidade, avaliámos a influência das bandas oligoclonais IgM no LCR nas características da EM à data da PL. Observámos que, de entre as variáveis demográficas (idade e sexo) e clínicas (duração da EM até à PL e primeiros sintomas) estudadas, apenas o valor médio de EDSS foi significativamente superior nos doentes com bandas oligoclonais IgM positivas em relação aos doentes sem BOC IgM.

De notar que, este valor médio de EDSS na data da PL se refere a uma avaliação efetuada em média cerca de 5 anos após o início dos sintomas. Assim, como primeiro comentário, estes resultados apontam para a presença de BOC IgM no LCR, como indicador pouco favorável em fases iniciais da doença, estando associado a uma maior incapacidade.

#### **4.3.1 Bandas oligoclonais IgM versus progressão da EM**

Seguindo o raciocínio atrás descrito para as BOC IgG fomos então comparar a progressão do EDSS ao longo da doença nos doentes com e sem bandas IgM. Apesar do EDSS ser sempre superior nos doentes com BOC IgM positivas nos diferentes momentos avaliados

(1, 3, 5, 10 e mais de 10 anos após o início da doença), as diferenças em relação aos doentes sem BOC IgM nunca atingiram significado estatístico. De salientar, que para algumas avaliações, o grupo de doentes com BOC IgM positivas era bastante pequeno (n=6), limitando por isso o poder da análise.

Das restantes análises realizadas, associando o EDSS como medida de severidade da doença e a presença de BOC IgM, apenas se registaram diferenças significativas na probabilidade dos doentes, durante a evolução da doença, alguma vez terem atingido um valor de EDSS igual ou superior a 6 (EDSS  $\times$  6). De facto, a percentagem de doentes com BOC IgM positivas que atingiu um EDSS  $\times$  6 nalgum momento foi significativamente superior, em relação aos doentes sem BOC IgM. Pelo contrário, quando comparámos os valores do último EDSS (que se refere em média a 7,5 anos após a PL), ou a probabilidade dos doentes atingirem um EDSS igual ou superior a 4 após dez anos de doença, não se encontraram diferenças significativas entre os doentes com e sem BOC IgM. Também na análise de sobrevivência não se observaram diferenças significativas no tempo estimado para atingir uma pontuação na escala de EDSS  $\times$  4 entre os doentes de EM com e sem BOC IgM. Os nossos resultados não são portanto, muito consistentes em associar a presença de BOC IgM a um pior prognóstico a longo prazo, pelo menos no que se refere à avaliação da incapacidade através da escala de EDSS.

Durante a última década, vários trabalhos têm apontado para a presença de BOC IgM como um indicador de mau prognóstico na EM e como estando associada a valores mais elevados de incapacidade na escala de EDSS. No entanto, a extrapolação destes resultados e a comparação com o nosso trabalho deve ser feita com algum cuidado, pois existem algumas diferenças metodológicas que têm que ser tidas em conta, como por exemplo a avaliação de BOC IgM totais vs. lípido-específicas e a grande variabilidade no tempo de seguimento dos doentes.

As investigações de Villar e coautores não mostraram alteração significativa no valor do EDSS no momento do diagnóstico da EM em função da presença ou não de BOC IgM, mas sim posteriormente (Villar et al. 2002b; Villar et al. 2003; Sola et al. 2011). Num dos trabalhos iniciais, com um seguimento médio de apenas 2 anos, o grupo de doentes com BOC IgM registou um *score* de EDSS significativamente superior ao grupo sem BOC IgM, indicando a síntese intratecal de IgM como um fator de prognóstico na fase inicial da doença. Os mesmos autores, num estudo que envolveu um total de 29 doentes (onze com BOC IgM positivas) e avaliou a probabilidade de atingir um *score* de EDSS=6,

mostrou que 63,63% dos doentes com BOC IgM positivas atingiu este valor, enquanto no grupo com BOC IgM negativas nenhum dos doentes atingiu este *score* durante um seguimento médio de cerca de 11 anos (Villar et al. 2003). Uma vez que as IgM são anticorpos com elevada eficiência na fixação do complemento, estes autores consideraram que esta imunoglobulina poderia assim desempenhar um papel mais agressivo na desmielinização em comparação com outros anticorpos, estando assim associada a um curso clínico mais severo (Villar et al. 2002a). Também outros autores corroboram esta teoria. Um estudo realizado por Perini e colaboradores envolvendo 80 doentes de EM, acompanhados durante 15 anos, observou um aumento significativo do grau de incapacidade no grupo com BOC IgM positivas (Perini et al. 2006). Os mesmos autores mostraram posteriormente que esta diferença só se tornava significativa após 5 anos de evolução da doença (Sola et al. 2011). O trabalho de Mandrioli e colaboradores em 2008, envolvendo 64 doentes CDMS, subdivididos em 38 com EM benigna (definida por um valor de EDSS igual ou inferior a 3, após uma duração da doença de 10 ou mais anos) e 26 doentes com EM severa (definida pelo *score* de EDSS igual ou superior a 4, após 10 ou menos anos de doença) mostrou que a presença ou ausência de BOC IgM era um fator determinante para atingir um valor de EDSS de 3 ou 4 ao fim de 10 anos (Mandrioli et al. 2008).

Como atrás referido, alguns estudos exploraram também, a síntese intratecal de BOC IgM lípido-específicas. Um trabalho de Villar e colaboradores acompanhado durante 5 anos envolvendo 54 doentes de EM e com BOC IgM no LCR apresentou 38 doentes com BOC IgM lípido-específicas. A presença de BOC IgM lípido-específicas foi associada a maior número de surtos e valores de EDSS mais elevados, evidenciando uma resposta imune persistente e conseqüentemente um curso mais agressivo da EM, em comparação com a presença de BOC IgM não lípido-específicas, que conferiu uma resposta imune transitória com menos surtos e menor EDSS, logo com uma evolução mais benigna da doença (Villar et al. 2008). Outro estudo de Villar e colaboradores com 81 doentes de EM e 21 controlos, seguidos em média 31 meses, também, concluiu que os doentes com BOC IgM lípido-específicas sofrem mais surtos e apresentaram maior severidade, revelando-se um fator de prognóstico mais robusto do que as BOC IgM totais (Villar et al. 2005a).

Outra apreciação interessante no prognóstico da EM foi observar o número de surtos, que reflete igualmente a severidade nas formas EMSR e relacioná-los com a presença de BOC IgM ao longo da doença. Observou-se um aumento quer do número médio total de surtos

quer da taxa de surtos nos doentes com BOC IgM positivas, em relação aos sem BOC IgM, que atingiu significado estatístico apenas no primeiro ano de doença após a PL. Estes resultados estão em linha com um estudo de Villar e colaboradores (2002b), que avaliando vinte e dois doentes, demonstrou no grupo BOC IgM positivas um aumento do número de surtos durante o acompanhamento, (entre 6 e 36 meses), em relação ao grupo BOC IgM negativas. Mais recentemente foi também demonstrado um aumento do número de novas lesões (Villar et al. 2002b; Durante et al. 2012), bem como um número mais elevado de surtos no subgrupo de doentes com BOC IgM positivas (Villar et al. 2002b; Durante et al. 2012; Ferraro et al. 2013). Segundo Bosca e colaboradores, num estudo com 192 doentes CIS que avaliou o risco da manifestação de um segundo surto, verificou que o tempo médio para o segundo surto foi significativamente inferior para os doentes com BOC IgG e BOC IgM líquido-específicas, relativamente aos doentes só com BOC IgG (Bosca et al. 2010).

No entanto, nem todos os trabalhos têm sido consensuais em comprovar que a presença de BOC IgM significa um pior prognóstico. Schneider e colaboradores, num estudo retrospectivo com 42 doentes de EM, revelaram uma positividade de BOG IgM de 74%, mas não detetaram qualquer correlação entre a presença de BOC IgM e o índice de IgM, o número de bandas ou mesmo o risco de surto durante um seguimento de 21 a 106 meses. Assim, não apoiaram a previsão de uma evolução da EM mais desfavorável na presença de BOC IgM (Schneider et al. 2007).

Avaliámos também, a associação entre a síntese intratecal de IgM no LCR e os diferentes fenótipos clínicos, registando-se no nosso trabalho uma positividade de 18,2% na forma EMSR; 8,3% no fenótipo EMSP e 13,3% no subtipo EMPP, sem diferenças significativas entre os grupos. Investigámos ainda, a possível relação da presença das BOC IgM com a percentagem de progressão do subtipo EMSR para EMSP no curso da EM. Apenas 1 dos 19 doentes com BOC IgM (5,3%) converteu para EMSP, enquanto nos doentes sem BOC IgM a percentagem de progressão foi de 11,5% (11 em 96), porém sem significado estatístico. Esta análise por subtipos está obviamente condicionada pela baixa percentagem de alguns destes subtipos (particularmente da EMPP), que aliada a baixa frequência das BOC IgM por si só, leva a comparações entre grupos com um tamanho muito pequeno. Assim se explica, muito provavelmente, a grande discrepância que existe na literatura relativamente à pesquisa das BOC IgM nos diferentes fenótipos clínicos de EM. Inicialmente encontraram-se diferenças na percentagem de BOC IgM positivas nos

diferentes subtipos, mais elevada nas formas progressivas (EMSR-32,4%, EMSP-87,5% e EMPP-71,4%) (Villar et al. 2002a), e também uma conversão de EMSR para secundária progressiva, mais rápida e maior severidade neurológica nos doentes com BOC IgM (Villar et al. 2003; Thangarajh et al. 2008). No entanto, outro trabalho do mesmo grupo revelou uma percentagem mais baixa de BOC IgM positivas nas formas EMPP (5% no subtipo EMPP e 41% no fenótipo EMSR) (Villar et al. 2002a). Este resultado de uma reduzida produção intratecal de IgM, particularmente de IgM específicas para lípidos membranares, nas formas PP foi posteriormente confirmado numa investigação mais alargada em 424 doentes de EM, envolvendo amostras de Espanha e Suécia, mostrando uma percentagem de BOC IgM positivas de 30% na EMSR, 60% na EMSP e 0% na EMPP (Villar et al. 2009). Mais recentemente, este resultado foi corroborado por outros autores, que também observaram uma redução da produção intratecal de IgM na EMPP (13%) em relação aos outros fenótipos clínicos (38% na EMSR e 63% na EMSP) (Sola et al. 2011). Estes autores consideram que a síntese intratecal de IgM é um forte preditor na evolução da doença, estando associado a maior severidade nas formas EMSR e EMSP. Já no subtipo EMPP, com um processo inflamatório menos intenso, as BOC IgM não influenciam o curso da EM, sendo este mais afetado por fatores biológicos como a idade de início e a manifestação dos sintomas iniciais sugerindo, assim, que não só diferentes mecanismos imunológicos como fisiopatológicos estão envolvidos na progressão dos diferentes subtipos de EM. Contudo, um estudo multicêntrico recente, só com doentes de EM da forma EMPP (n=80) mostrou uma positividade de BOC IgM entre os 22 e 49%, portanto na linha do que é geralmente aceite para os doentes de EM, em geral (Villar et al. 2014). Neste estudo, a presença de BOC IgM no LCR, foi apontada como um marcador para um subconjunto de doentes EMPP com doença inflamatória mais ativa que, portanto, poderia beneficiar com tratamentos direcionados ao sistema imune.

No nosso trabalho tentámos relacionar a presença das BOC IgM com a terapêutica instituída durante o curso da doença, particularmente com a necessidade de administração de terapêutica de 2ª linha. Verificámos que 44% dos doentes estudados foram submetidos a terapêutica de 2ª linha, indicativa de uma forma mais agressiva da doença, mas este facto não pareceu estar associado à presença de BOC IgM. No entanto, os doentes que apenas realizaram terapia de 1ª linha revelaram uma duração média da EM estatisticamente inferior, em relação aos doentes que alguma vez efetuaram terapia de 2ª linha, o que poderá influenciar esta análise. Segundo Ferraro e coautores, quando além

das BOC IgM no LCR são tidos em consideração outros indicadores de pior prognóstico, como idade jovem no início da EM ou a recuperação incompleta de uma grande lesão detetada por RM e ainda, a presença de BOC IgG com uma contagem de células anormal no LCR, estes fatores podem fornecer uma preciosa ajuda ao clínico, na orientação de decisões terapêuticas durante o acompanhamento do doente CIS (Ferraro et al. 2013).

Como sumário da investigação da síntese intratecal de IgM, de uma forma geral não conseguimos comprovar a associação entre a presença de BOC IgM e formas mais agressivas da doença sugeridas por outros autores. Apesar de alguns dos nossos resultados apontarem para um pior prognóstico, particularmente a curto e médio prazo, não conseguimos demonstrar de uma forma robusta um aumento da incapacidade a longo prazo nos doentes com BOC IgM. Um dos fatores que pode ter contribuído para tal, poderá ser, como já referido anteriormente, a reduzida percentagem de doentes de EM com BOC IgM na nossa população. Por outro lado, os nossos resultados poderão estar a ser fortemente influenciados pelo efeito das terapêuticas a que os doentes foram sujeitos no curso da doença. De facto, todos os doentes incluídos neste estudo fizeram medicação com DMTs (cerca de 40% dos quais com fármacos de 2ª linha), que modificam o curso natural da doença, podendo assim introduzir algum viés aos resultados, e atenuar a medição da acumulação de incapacidade. Muito recentemente, um estudo italiano avaliou a presença de BOC IgM, tendo em conta o aparecimento da primeira DMT em 1995. Para tal, compararam um grupo de 69 doentes de EM avaliados antes de 1995 com um grupo de 267 doentes de EM avaliados após 1995. Registaram uma diminuição acentuada na presença das BOC IgM nos doentes aos quais foi administrada a DMT (24% vs. 39%). Além disso, as BOC IgM no LCR foram preditivas de maior severidade a longo prazo apenas em doentes com início da EM antes do aparecimento da DMT (Ferraro et al. 2017).

#### **4.4 Marcadores de disfunção da BHE ó MMPs, TIMPs e CAMs**

A disrupção da BHE é um mecanismo complexo e dependente de muitos fatores, células endoteliais, células imunes e moléculas várias incluindo a expressão das MMPs e a interação sequencial de moléculas de adesão celular.

Mantendo o objetivo da investigação, continuámos a pesquisa sobre possíveis indicadores de prognóstico, avaliando agora alguns marcadores de disfunção da BHE:

metaloproteinases e respetivos inibidores (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) e moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1, E-Selelina). Como já descrito anteriormente, usámos para tal amostras de LCR e soro de doentes de EM (n=51) e doentes com outras doenças inflamatórias (n=33) e não inflamatórias do SNC (n=21), constituindo um subconjunto dos doentes que integraram o estudo anterior. Assim, as características gerais da população deste estudo no momento da colheita, são semelhantes às em cima descritas, mantendo-se, nos doentes de EM o predomínio do sexo feminino, uma idade média (cerca de 36 anos) inferior comparativamente aos grupos controlo, uma duração média da doença à data da PL próxima dos 5 anos, e um EDSS médio de cerca de 2,5. De referir que uma versão preliminar do presente estudo, efetuada num total de 71 doentes dos quais 12 com patologias não inflamatórias, catorze com outras patologias inflamatórias do SNC e os restantes doentes de EM divididos em surto-remissão (n=33) e formas progressivas (n=12), foi já apresentado (Valado et al. 2012).

Ao analisarmos as concentrações das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) e respetivos inibidores tecidulares (TIMP-2 e TIMP-1), nos três grupos, verificámos que a concentração da MMP-2 no soro era significativamente superior nos doentes de EM em relação aos doentes com outras doenças inflamatórias do SNC. Já para o respetivo inibidor desta metaloproteinase, o TIMP-2, observámos uma diminuição significativa dos seus níveis séricos nos doentes de EM, em comparação com os grupos de doenças não inflamatórias e doenças inflamatórias do SNC. Ao calcularmos então a razão MMP-2/TIMP-2 no soro, esta mostrou-se significativamente aumentada para os doentes de EM, comparativamente aos dois grupos controlo. Para os outros pares MMP e respetivo inibidor, apesar de não se encontrarem diferenças nos seus valores individuais, também se registaram diferenças nas suas razões, como um aumento significativo quer da razão MMP-2/TIMP-2, quer da MMP-9/TIMP-1 no LCR dos doentes de EM. De salientar que, enquanto a razão MMP-9/TIMP-1 apenas se revelou diferenciadora em relação ao grupo DNI, e portanto parece ser um achado comum aos doentes de EM e com outras doenças inflamatórias do SNC, a razão MMP-2/TIMP-2 revelou diferenças em relação aos dois grupos de controlos neurológicos e portanto poderá ser específica da EM. Estes resultados corroboram os preliminares, já apresentados (Valado et al. 2012). De salientar, que para o grupo de doentes de EM, se observaram correlações positivas significativas entre a MMP-2 e o respetivo inibidor, em ambos os fluídos biológicos, mas não entre a MMP-9 e o seu inibidor TIMP-1. De notar ainda que, nos três grupos de estudo, as concentrações

de todos os parâmetros no LCR foram sempre inferiores às do soro, sendo esta diferença mais pronunciada para a MMP-9. No entanto, a razão entre os níveis no LCR e soro para todos os marcadores não registaram diferenças significativas entre os grupos.

Os nossos resultados relativos a MMP-2 e TIMP-2 estão em linha com os apresentados por Fainardi e coautores num estudo com 67 doentes de EMSR e controlos (64 doentes com outras patologias neurológicas inflamatórias e 65 doentes com patologias neurológicas não inflamatórias), em que a atividade da MMP-2, bem como da razão MMP-2/TIMP-2 estava elevada nos doentes de EM, quer no LCR quer no soro (Fainardi et al. 2009). Valores aumentados de TIMP-2 foram também reportados em monócitos de doentes de EM (Mirshafiey et al. 2014). Já o estudo de Avolio e colaboradores, não registou diferenças nos níveis de MMP-2 e TIMP-2 no soro entre doentes de EM em geral e controlos saudáveis (Avolio et al. 2003), mas apenas em doentes com formas progressivas da doença, o que foi posteriormente replicado por (Benesova et al. 2009). Também, o trabalho de Trentini e colaboradores registou uma atividade semelhante da MMP-2 nos três grupos em análise: doentes de EM (n=89), doentes com outras doenças neurológicas (n=92) e controlos saudáveis (n=40) (Trentini et al. 2016). Relativamente à MMP-9, bem como a razão MMP-9/TIMP-1, diversos estudos têm encontrado níveis elevados quer em relação a controlos saudáveis (Benesova et al. 2009), quer a controlos neurológicos ((Liuzzi et al. 2002; Boz et al. 2006; Trentini et al. 2016). De facto, no estudo de Trentini e colaboradores, a elevada proporção de doentes com níveis elevados de atividade da MMP-9 no LCR, revelou um risco acrescido para desenvolver EM de 2,52 com um intervalo de variação entre 1,39-4,59 (Trentini et al. 2016). Estas observações são corroboradas por descrições de um aumento dos níveis de ARNm de MMP-9 em células mononucleares do sangue periférico (Lee et al. 1999; Lichtinghagen et al. 1999; Waubant et al. 1999a; Liuzzi et al. 2002). Mais recentemente foi também reportado, um aumento da expressão de MMP-9 e uma diminuição da expressão do microARN-320a, que tem como alvo o ARNm de MMP-9, em linfócitos B de doentes de EM em fase de surto. Também, na substância branca aparentemente normal e em lesões de doentes de EM encontraram-se níveis aumentados de MMP-9 e MMP-7 (Lindberg et al. 2001).

A comparação entre os nossos resultados e os trabalhos descritos em cima tem contudo que ser feita com alguma cautela. Ao contrário de vários dos estudos atrás mencionados, no nosso trabalho os doentes de EM foram considerados como um todo e não

subdivididos pelos diferentes fenótipos clínicos ou fases ativas/remissão. Para tal contribuiu, sem dúvida, o reduzido número de doentes e volume dos fluídos biológicos, especialmente do LCR, que certamente enfraqueceria a consistência dos resultados e as conclusões que daí poderiam advir. Para além disso, uma vez que as nossas amostras foram colhidas aquando da realização da punção lombar para investigação diagnóstica, será de admitir que a grande maioria dos doentes estivessem em fase ativa da doença. Um outro fator importante, que certamente condicionou o facto de não termos analisado os nossos resultados em termos de doença ativa e não ativa, foi a ausência de dados imagiológicos, essencial no exame clínico para determinação da atividade da EM (Miller et al. 1993). De facto, em estudos anteriores (Fainardi et al. 2009; Trentini et al. 2015) foram observadas diferenças em MMPs ativas apenas quando os doentes foram classificados em doença ativa ou não ativa baseada em achados de RM (Trentini et al. 2016).

Segundo Avolio, a elevada atividade da MMP-9 caracteriza surtos de curta duração e formas ativas da EM, enquanto um aumento da razão MMP-2/TIMP-2 estará associada à fase crónica progressiva da doença (Avolio et al. 2003). Por outro lado, a produção elevada de TIMP-2 durante os surtos de curta duração, além de bloquear a atividade da MMP-2, pode também tentar neutralizar a MMP-9, embora com menor eficácia (Lee et al. 1999). De facto, embora TIMP-1 e TIMP-2 inibam preferencialmente MMP-9 e MMP-2, respetivamente (Brew et al. 2000), a sobreposição é possível. Assim, de acordo com a hipótese de Bever e Rosenberg, no início da formação das lesões, o aumento da atividade da MMP-9 leva à disrupção da BHE e, mais tarde, durante os processos de reparação, TIMPs e MMP-2 podem predominar para remodelar a matriz extracelular, o que pode corresponder à fase crónica progressiva da EM (Bever e Rosenberg 1999).

Relativamente aos níveis das formas solúveis das moléculas de adesão, os nossos resultados mostraram diferenças significativas entre os grupos para as três moléculas avaliadas (sICAM-1; sVCAM-1; sE-Selelina), mas apenas no LCR. Enquanto a concentração de sICAM-1 no LCR se mostrou significativamente elevada nos grupos EM e DI vs. DNI, o aumento da sE-Selelina no LCR foi específico para o grupo de doentes de EM. Já os níveis de sVCAM-1 no LCR foram inferiores nos doentes de EM relativamente aos doentes com patologias inflamatórias. Uma vez que os níveis destas moléculas de adesão no soro não apresentaram diferenças entre os três grupos de estudo, as razões LCR/soro destas moléculas apresentaram o mesmo perfil de variação já

observado no LCR. Assim, enquanto o aumento da razão LCR/soro da sICAM-1 é comum aos dois grupos de doenças inflamatórias do SNC (EM e DI), o aumento da razão LCR/soro da E-Selectina-1 parece ser específico da EM. Por seu lado, o aumento da razão LCR/soro da sVCAM-1 é característico do grupo de outras doenças inflamatórias do SNC, mas não da EM. No grupo de doentes de EM observámos uma correlação positiva entre a E-Selectina-1 e a sICAM-1 e negativa com a sVCAM-1.

Os nossos resultados relativamente aos aumentos da sICAM-1 e sE-Selectina no LCR dos doentes de EM estão em linha com outros estudos. Droogan e colaboradores também encontraram um aumento da sICAM-1 no LCR de doentes de EM (n=56), relativamente a controlos neurológicos (doenças neurológicas inflamatórias; n=30 e doenças neurológicas não inflamatórias; n=43) (Droogan et al. 1996), assim como McDonnell e coautores (McDonnell et al. 1998), enquanto Alves-Leon e colaboradores reportaram um aumento de sICAM-1, quer no soro quer no LCR, nos doentes de EM relativamente a controlos saudáveis e doentes sem patologia neurológica (Alves-Leon et al. 2001). Aumentos dos níveis de sE-Selectina no LCR nos doentes de EM, face a um grupo controlo de doentes com cefaleias foram também reportados por outros autores (Correale e Bassani Molinas Mde 2003). No entanto, outros trabalhos não encontraram diferenças neste marcador entre doentes e controlos e apresentaram algumas discrepâncias relativamente ao subtipo de EM (surto-remissão vs. progressiva) que apresentou níveis mais elevados de sE-Selectina (McDonnell et al. 1998; Kuenz et al. 2005). Relativamente à sVCAM-1, o nosso resultado mostrou que os níveis desta molécula de adesão no LCR estavam aumentados no grupo de outras doenças inflamatórias não EM, contrapõe os resultados de estudos anteriores, que encontraram aumentos da sVCAM-1 no LCR de doentes de EM em relação a outros doentes com patologia neurológica não inflamatória (Droogan et al. 1996; McDonnell et al. 1998; Correale e Bassani Molinas Mde 2003). Mais recentemente contudo, um estudo em amostras de LCR de doentes com NMO registou concentrações de sVCAM-1 superiores relativamente a doentes de EM, sem diferenças a nível do soro (Uzawa et al. 2011). Também, um estudo efetuado num grupo de 29 doentes com sintomatologia de neurite ótica encontrou níveis significativamente mais baixos de sVCAM-1 no soro nos doentes que desenvolveram EM durante o seguimento (Kalinowska-Lyszczarz et al. 2016).

Mais uma vez, as diferenças entre os nossos resultados e alguns dos resultados da literatura podem estar relacionadas com o facto de termos considerado os doentes de EM

como um todo, sem subdivisão pelos diferentes fenótipos clínicos ou fases ativas e não ativas. De facto, o aumento na sVCAM-1 no LCR tem sido apontado como um marcador de atividade da EM, aumentando a permeabilidade BHE através da reorganização da actina do citoesqueleto e com redução das *tight junction* (Haarmann et al. 2015). Além disso, as diferentes composições dos grupos controlo (controlos saudáveis/doentes não neurológicos/doentes com outras patologias neurológicas inflamatórias ou não), podem também estar na base de algumas das diferenças encontradas. De qualquer forma, os nossos resultados mostraram um aumento da molécula sE-Seletina no LCR, expressa pelas células endoteliais ativadas pós estímulos pró-inflamatórios com regulação da interação leucócito-endotélio, bem como da sICAM no LCR promovendo a ligação das células T ao endotélio. Porém como a sVCAM no LCR, assim como a razão LCR/soro, estão diminuídas nos doentes de EM relativamente a outras doenças inflamatórias do SNC, tal poderá corresponder a menor transmigração celular na fase inicial da EM, tendo em conta que as determinações séricas ou em LCR procuram refletir os níveis de expressão celular nos respetivos ambientes.

Em suma, os nossos resultados apoiam o envolvimento da ativação de metaloproteinases e moléculas de adesão na patogénese da esclerose múltipla, sendo que nalguns casos as moléculas envolvidas parecem ser específicas para esta patologia (caso da MMP-2/TIMP-2 e da E-Seletina), enquanto noutros serão comuns a outras patologias inflamatórias do SNC (MMP-9 e sICAM-1).

#### **4.4.1 Marcadores de disfunção da BHE versus progressão da EM**

De seguida fomos investigar a possível relação entre estes marcadores de disfunção da BHE, avaliados no momento de diagnóstico, com a posterior progressão da esclerose múltipla. Para tal, começámos por analisar como indicador de progressão o grau de incapacidade na escala de EDSS registado na última avaliação clínica dos doentes e após 10 anos de EM. Usando o valor de corte de EDSS=4, comparámos então as concentrações dos diferentes marcadores de disfunção da BHE nos doentes que atingiam ou não este índice de severidade no curso da doença. O único marcador que revelou diferenças significativas foi a sVCAM-1 no soro, que registou uma concentração mais elevada no grupo de doentes que atingiu um EDSS igual ou superior a 4 na última avaliação clínica. Estes resultados corroboram o estudo preliminar (Valado et al. 2012). Ao analisar a

relação dos diferentes marcadores entre o LCR e o soro, observámos, pelo contrário, um aumento significativo da razão da sE-Seletina nos doentes que não atingem um EDSS de 4. De notar, a análise de correlação tinha registado uma correlação negativa entre a concentração da sE-Seletina no LCR e da sVCAM-1 no soro. Relativamente às metaloproteinases, observámos um aumento significativo na razão sérica MMP-9/TIMP-1 no grupo de doentes que apresentou, ao fim de 10 anos, um EDSS inferior a 4, bem como uma tendência para um aumento da concentração de MMP-9 e diminuição da MMP-2 no soro deste grupo de doentes. Acresce que o modelo de regressão logística identificou como variáveis preditivas do grau de incapacidade, somente a sVCAM-1 no soro e ainda, marginalmente, a razão MMP-9/TIMP-1 no LCR. Dado o número reduzido de doentes incluídos nesta análise, e a elevada variabilidade que os níveis dos diferentes marcadores apresentaram na amostra, é possível que algumas tendências atingissem significado estatístico caso o tamanho da amostra fosse maior. É contudo, de salientar que os marcadores identificados pelo nosso modelo como preditores de incapacidade, foram exatamente os alvos biológicos de algumas das abordagens terapêuticas mais usadas na EM, ou seja a MMP-9 e o TIMP-1 como alvos do IFN  $\beta$ , e a VCAM-1 que interage com a integrina  $\alpha$ -4 dos leucócitos, alvo do natalizumab.

Uma vez que os fenótipos clínicos estão interligados com a progressão da EM, com as fases progressivas habitualmente associadas a valores de EDSS mais elevados, os resultados da expressão dos marcadores de disfunção da BHE em função destes fenótipos (formas surto-remissão vs. formas progressivas) estão de acordo com os descritos em cima. Assim, foi possível observar um aumento significativo da MMP-9/TIMP-1 no LCR nos doentes que apresentam no curso da doença um fenótipo surto-remissão, associada a uma tendência para o aumento da concentração da MMP-9 no LCR e da diminuição na razão MMP-2/TIMP-2 no soro. Em linha com o que já tinha sido observado para a associação com valores mais elevados de EDSS, a concentração de sVCAM-1 no LCR apresentou uma tendência para estar aumentada nos doentes que desenvolveram formas progressivas de EM. Relativamente à relação entre a concentração dos diferentes marcadores e a terapêutica administrada aos doentes de EM durante o curso da doença, não se encontraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros analisados entre os doentes que no curso da doença apenas realizaram terapia de 1ª linha e os que alguma vez necessitaram de terapia de 2ª linha. Também, aqui o reduzido número de doentes certamente não permitiu resultados conclusivos.

De um modo geral estes nossos resultados estão de acordo com o trabalho de Benesová e colaboradores que mostraram níveis superiores da MMP-2 e da razão MMP-2/TIMP-2 séricas, em doentes com uma duração média da doença de 10 anos e um valor médio de EDSS 6,2, apresentando um aumento da incapacidade e severidade da EM associadas ao EDSS (Benesova et al. 2008). De facto, o aumento dos níveis da MMP-2, bem como da razão MMP-2/TIMP-2 no soro tem sido associado a formas progressivas de EM (Avolio et al. 2003; Benesova et al. 2008; Benesova et al. 2009). Assim, se por um lado, o acréscimo dos níveis da MMP-2 no soro pode espelhar o aumento da destruição de lesões crónicas com remodelação da matriz extracelular e consequente reparação do tecido nervoso (Avolio et al. 2003), por outro pode associar-se a maior incapacidade do doente e severidade da doença (Benesova et al. 2009). Relativamente à MMP-9, os nossos resultados também estão em linha com a visão deste ser um marcador de doença ativa, estando o aumento da sua concentração sérica, bem como a razão MMP-9/TIMP-1, geralmente associada a formas EMSR (Avolio et al. 2003; Benesova et al. 2009). De facto, a razão MMP-9/TMIP-1 no soro foi proposta como um marcador preditivo da atividade imagiológica da doença nas formas surto-remissão (Avolio et al. 2005). Também o aumento dos níveis da MMP-9 no LCR foi reportado em todos os doentes EMSR e apenas em 57% dos doentes na forma primária progressiva (Leppert et al. 1998), podendo o aumento da atividade da MMP-9 no LCR ser considerado um indicador de progressão da inflamação (Trentini et al. 2016). Em conformidade com os nossos resultados, também Elovaara e colaboradores relataram níveis de sVCAM-1 no soro inferiores em EMSR comparativamente à forma secundária progressiva (Elovaara et al. 2000).

Em síntese, na relação dos marcadores de disrupção da BHE com a progressão da EM, os nossos resultados mostraram um aumento da sVCAM-1, e tendencialmente da MMP-2, associadas a um fenótipo de doença mais agressivo (formas progressivas e valores mais elevados de EDSS). Já um aumento da razão MMP-9/TIMP-1 no LCR revelou-se consistentemente associada a um menor grau de incapacidade no curso da doença e a um fenótipo do tipo surto-remissão.

Por fim analisou-se a relação das metaloproteinases, respetivos inibidores tecidulares e moléculas de adesão celular com a presença de bandas oligoclonais do tipo IgG e IgM. A síntese intratecal de IgG mostrou uma associação com níveis superiores de sICAM-1 no soro, e uma consequente redução da razão dos níveis desta molécula de adesão LCR/soro.

Observou-se ainda um aumento significativo na razão LCR/soro da MMP-9 e uma tendência para valores superiores na razão LCR/soro da sE-Seletina nos doentes com BOC IgG. Já a síntese intratecal de IgM mostrou apenas uma associação com a redução na concentração de TIMP-2 no LCR, que contudo não se refletiu na razão MMP-2/TIMP-2. Para consolidar estes resultados seria essencial a realização de mais estudos. Dado o desequilíbrio observado na distribuição das BOC IgG e IgM positivas e negativas, esta análise encontra-se fortemente limitada pelo número muito baixo de doentes de EM com BOC IgG negativas (n=3) e IgM positivas (n=5) incluídos.

Estudos prévios revelaram também uma associação da presença de BOC IgG com um aumento das concentrações no LCR de sICAM-1 (Droogan et al. 1996) e de sVCAM-1 (Droogan et al. 1996; McMillan et al. 2000). Portanto, apesar da sua fragilidade, os nossos resultados revelam alguma coerência com a literatura, associando um perfil de maior disrupção da BHE (com aumento da expressão de sICAM-1 a nível periférico e ativação de metaloproteinases a nível central), capaz de recrutar mais células imunes que atravessam a barreira e continuam o processo inflamatório no SNC, com uma síntese intratecal de imunoglobulinas.

#### **4.5 Polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 e EM**

Reconhecendo a função das metaloproteinases em geral, e da MMP-9 em particular, na fisiopatologia da EM e como alvo da abordagem terapêutica, fomos investigar sobre a presença do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9, numa população Portuguesa e caucasiana de doentes de EM. Pretendemos assim, avaliar não só o seu impacto na suscetibilidade à doença, mas também o seu eventual papel como indicador de prognóstico na esclerose múltipla.

A investigação envolveu uma população homogénea e geneticamente estável, subdividida em doentes de EM (n=169) e controlos saudáveis (n=186), que não apresentaram diferenças relativamente à distribuição por sexo e a idade média na data da colheita sanguínea. Como já descrito anteriormente, as características clínicas dos doentes de EM que integraram este estudo eram diferentes das dos trabalhos anteriores, particularmente em relação à duração da doença na altura da colheita e ao facto de todos os doentes estarem medicados com DMTs.

A distribuição dos genótipos do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 na nossa população de doentes (77% CC; 21% CT; 2% TT) foi muito idêntica à descrita noutros coortes de doentes de EM da Sérvia, República Checa ou do Brasil (Zivkovic et al. 2007; Benesova et al. 2008; Fernandes et al. 2009). Em oposição, doentes de EM da Polónia ou da Itália apresentaram uma frequência do alelo T muito superior (32-45% vs. 12% no nosso estudo) (Mirowska-Guzel et al. 2009; La Russa et al. 2010). Os nossos resultados não mostraram diferenças na distribuição do polimorfismo -1562 C/T entre os doentes de EM e controlos, sugerindo que a presença deste polimorfismo não estará associada a um aumento da suscetibilidade para desenvolver EM. Tal está de acordo com alguns estudos prévios (Zivkovic et al. 2007; Fernandes et al. 2009) e também com um trabalho de meta-análise muito recente incluindo 2686 casos e 2459 controlos (Nischwitz et al. 2015). No entanto, os nossos resultados divergem de outros autores que encontraram quer um decréscimo marginal (Benesova et al. 2008), quer um aumento da frequência do alelo T em doentes de EM (Mirowska-Guzel et al. 2009; La Russa et al. 2010). Além destes estudos específicos, um estudo de associação do genoma, curiosamente relatou uma forte evidência da associação entre o SNP rs2425752 e doentes de EM (Sawcer et al. 2011). Este SNP está localizado no gene CD40 que é próximo do gene da MMP-9 (cerca de 66 000 pb a partir -1562 C/T), sugerindo que ambas as variantes podem estar relacionadas com a EM. Digno de nota, no estudo de outra doença autoimune, verificou-se surpreendentemente que o alelo T do polimorfismo -1562 C/T da MMP-9 protege os doentes com o fenómeno primário de *Sjögren* de *Raynaud* (Hulkkonen et al. 2004), indicando uma possível base análoga em processos autoimunes. Acresce, também, um estudo de meta-análise muito recente envolvendo 2034 casos e 1861 controlos, que concluiu que o polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 pode estar associado com a suscetibilidade para múltiplas doenças autoimunes, que não EM, especialmente em indivíduos caucasianos (Li et al. 2017).

Esta inconsistência dos resultados obtidos em diferentes estudos pode ser devida tanto à verdadeira variabilidade genética entre diferentes populações ou a resultados falsamente positivos ou negativos. Em particular, a estratificação da população, erros de classificação e métodos estatísticos inadequados representaram possíveis causas de resultados falsos positivos (Abou-Sleiman et al. 2006). Além disso, discrepâncias no desenho do estudo e análise de dados poderão explicar as discordâncias entre os estudos. As diferenças na prevalência de doentes EMSR/EMSP ou a idade de início poderia ser um ponto crítico

nesses estudos como já foi salientado por (Fiotti et al. 2004). No nosso trabalho é de notar que a análise foi repetida considerando apenas os doentes com EMSR (n=143) e as conclusões foram semelhantes às obtidas com a população total de doentes de EM. As discrepâncias podem também ser explicadas pela heterogeneidade genética entre as populações, como tem sido demonstrado para a região do gene WFDC, provavelmente conduzido pela diversidade de agentes patogénicos em diferentes continentes (Ferreira et al. 2013). Além disso, como a prevalência da EM diminui dos polos para o equador, a presença de fatores de risco genéticos para EM pode ocorrer com maior frequência nos países do norte da Europa (Hauser e Oksenberg 2006). Portanto, mais estudos sobre as variantes regionais de genes putativos de suscetibilidade ao desenvolvimento da EM são ainda necessários.

Quando analisámos a distribuição do polimorfismo na nossa população em ambos os géneros, observámos um aumento significativo na frequência do alelo T e na distribuição do genótipo CT+TT nos doentes do sexo feminino em relação aos doentes do sexo masculino. Comparando também a distribuição entre doentes de EM e controlos do sexo feminino, encontramos um ligeiro aumento do alelo T nos doentes, porém sem significado estatístico. Este resultado está em desacordo com os trabalhos de (Zivkovic et al. 2007; Benesova et al. 2008; Nischwitz et al. 2015), que mostraram uma diminuição significativa do alelo T em doentes de EM do sexo feminino em comparação com controlos saudáveis do sexo feminino, e também com (Mirowska-Guzel et al. 2009) e (La Russa et al. 2010), que não encontraram diferenças significativas na distribuição de alelos entre doentes de EM e controlos saudáveis em função do sexo. O nosso resultado deve, contudo, ser interpretado com alguma cautela, pois pode estar a ser influenciado pelo maior risco e incidência de indivíduos de sexo feminino no grupo de EM. De facto, mais de dois terços da nossa população, quer de doentes de EM, quer de controlos, eram mulheres, resultando portanto numa sobre-expressão deste grupo. Além disso, uma vez que a frequência do alelo T na nossa população é bastante baixa, e o tamanho da amostra não é muito grande, a associação encontrada entre o polimorfismo -1562 C/T e o sexo feminino, pode, na realidade estar relacionada com a maior prevalência das mulheres e não com as características intrínsecas deste género.

Relativamente ao eventual papel do polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 como indicador de prognóstico na EM, na nossa investigação não encontramos qualquer associação significativa entre este polimorfismo e as variáveis clínicas consideradas

(idade de início da EM, a duração da doença, os sintomas iniciais, os subtipos clínicos, o grau de incapacidade da EM e o tipo de terapêutica administrada). A presença do polimorfismo também não pareceu influenciar a probabilidade dos doentes atingirem ou não, durante o curso da doença, um EDSS igual ou superior a três. De facto, a análise de um modelo de regressão logística revelou que, a única variável que mostrou uma associação com o polimorfismo foi, novamente, o sexo. Poucos estudos têm abordado esta questão e, em geral, também não encontraram diferenças no que respeita à incapacidade, subtipos clínicos da EM, idade de início ou duração da doença, entre os genótipos (Zivkovic et al. 2007; Benesova et al. 2008; Mirowska-Guzel et al. 2009; La Russa et al. 2010). Em contrapartida, no estudo de Fernandes et al. (2009), embora o polimorfismo não estivesse associado à doença, os resultados sugerem que o alelo T em homozigotia estaria relacionado com um aumento do grau de incapacidade (Fernandes et al. 2009). Porém, o nosso trabalho apenas registou 4 doentes de EM com o alelo T em homozigotia, pelo que, não nos permitiu confirmar a relação encontrada por Fernandes e coautores em 2009. Em adição podemos acrescentar que todos os doentes que manifestaram o alelo T em homozigotia eram do sexo feminino.

Em relação ao polimorfismo microssatélite CA<sub>n</sub>, no estudo de Fiotti et al. (2004), a presença de maior número de microssatélites foi associada com idade mais precoce no início da doença (Fiotti et al. 2004).

#### **4.5.1 Relação entre o polimorfismo -1562 C/T, a concentração sérica de MMP-9 e características clínicas**

Seguidamente, avaliámos a concentração sérica de MMP-9 num subgrupo de doentes de EM e controlos para os quais o polimorfismo -1562 C/T do gene da MMP-9 tinha sido determinado. Os nossos resultados mostram um aumento significativo da concentração sérica da MMP-9 em doentes de EM relativamente a controlos saudáveis, de acordo com o previamente reportado por outros estudos (Liuzzi et al. 2002; Avolio et al. 2003; Benesova et al. 2009). No nosso trabalho, as concentrações da MMP-9 não foram influenciadas pela presença do polimorfismo -1562 C/T, quer na população total, quer nos doentes de EM. Porém, nos controlos, as concentrações da MMP-9 estavam significativamente aumentadas nos portadores do alelo T. Apenas dois outros pequenos estudos investigaram a relação entre o polimorfismo e os níveis séricos da MMP-9.

Fernandes e colaboradores (2012) avaliaram a atividade plasmática da MMP-9 por zimografia e reportaram concentrações mais elevadas em doentes de EM portadores do polimorfismo. No entanto, indivíduos controlo apresentaram uma atividade idêntica da MMP-9 entre genótipos (Fernandes et al. 2012). No estudo de Mirowska-Guzel e coautores, os níveis periféricos da MMP-9 foram avaliados por ELISA, num reduzido grupo de doentes de EM (n=15) e as concentrações mais elevadas foram encontradas em portadores do alelo T (Mirowska-Guzel et al. 2009). Portanto, uma comparação direta com o nosso estudo é difícil de estabelecer, quer devido ao reduzido número de doentes estudados quer à diferente metodologia e tipo de amostras utilizada (soro vs. plasma). De facto, tem sido sugerido que durante o processo de coagulação, pode haver libertação de MMP-9 de plaquetas e leucócitos, levando assim a um aumento da concentração de MMP-9 no soro, que não se correlaciona com os níveis plasmáticos de MMP-9 em indivíduos saudáveis (Gerlach et al. 2007). Pelo contrário, em situações patológicas, parece existir uma boa correlação entre as concentrações de MMP-9 no soro e plasma, o que valida o uso de amostras de soro para avaliação de MMP-9 em estudos clínicos (Gerlach et al. 2009).

Os nossos resultados indicam então que, numa situação fisiológica, as concentrações da MMP-9 são efetivamente reguladas pelo polimorfismo -1562 C/T, estando a substituição de C por T associada ao aumento da expressão da MMP-9. No entanto, em doentes de EM, esta regulação perde-se, e as concentrações séricas da MMP-9 tornam-se independentes do polimorfismo. Uma possível explicação é o facto de grande parte dos nossos doentes (mais de 50%) estar medicada com IFN . Este tratamento, como discutiremos mais à frente, tem como um dos seus alvos terapêuticos a MMP-9. De facto, a terapia com IFN induziu uma redução significativa da concentração da MMP-9 na nossa população de doentes. Por conseguinte, é possível que os nossos resultados estejam a ser influenciados pelo efeito dos agentes terapêuticos. Se o nosso coorte consistisse em doentes ainda não submetidos à terapia com IFN o aumento da concentração da MMP-9 em relação aos controlos poderia até ser mais pronunciado e os resultados em relação à influência do polimorfismo poderiam ser diferentes.

Não encontramos diferenças nas concentrações séricas da MMP-9 nos doentes de EM em relação ao sexo, tipo de sintomas iniciais, subtipos clínicos da doença ou conversão de EMSR para EMSP. Também, não foi observada nenhuma correlação entre as concentrações séricas da MMP-9 e a idade de início da doença, a duração da EM e o

EDSS. Num dos poucos estudos existentes a avaliar a relação entre o polimorfismo -1562 C/T, os níveis de MMP-9 e o curso clínico da EM, foi observada uma correlação entre a atividade plasmática da MMP-9 e o EDSS (Fernandes et al. 2012). Também no nosso trabalho foram observadas concentrações séricas da MMP-9 ligeiramente aumentadas em doentes que atingiram um EDSS  $\times 3$ , embora não estatisticamente significativas.

Como já foi referido, o nosso estudo mostrou uma diminuição das concentrações da MMP-9 nos doentes tratados com IFN . Estudos anteriores têm demonstrado que a terapia com IFN induz uma diminuição das concentrações da MMP-9 (Galboiz et al. 2001; Comabella et al. 2009; Alexander et al. 2010; Yilmaz et al. 2012) e um aumento das concentrações de TIMP-1 (Galboiz et al. 2001; Comabella et al. 2009; Alexander et al. 2010). Como a integridade da matriz extracelular é mantida por um equilíbrio dinâmico entre a síntese e a proteólise dos seus componentes, as concentrações elevadas de TIMP-1 são encontradas em doentes que respondem ao IFN podendo inibir a proteólise da matriz extracelular induzida por MMP-9 e, assim, contribuir para a restauração da integridade da BHE. Este mecanismo pode, em última análise correlacionar-se com a estabilização clínica encontrada em doentes com EMSR que respondem à terapia com IFN (Comabella et al. 2009). No nosso trabalho houve também uma tendência para uma associação entre concentrações séricas da MMP-9 mais elevadas nos doentes em que houve necessidade de iniciar a terapêutica de 2ª linha, pois não responderam à terapia de 1ª linha. Curiosamente, os nossos resultados têm alguma semelhança com os resultados de Fernandes e colaboradores (2012). Estes autores consideraram que os doentes de EM que desenvolviam mais do que dois surtos num período de dois anos eram resistentes à terapia de 1ª linha, e observaram um aumento significativo da atividade da MMP-9 plasmática em comparação com doentes que respondiam à terapêutica de 1ª linha. Os fármacos de 2ª linha não atuam ao nível da MMP-9 (Du Pasquier et al. 2014) e isso poderá explicar o aumento das concentrações da MMP-9 que observámos em doentes submetidos a este tipo de terapêutica. Também é importante referir que as terapias de 2ª linha são conhecidas por serem mais eficazes no controlo da atividade da doença e progressão da incapacidade, assim, uma eventual correlação significativa entre o *score* do EDSS e as concentrações séricas da MMP-9 no nosso estudo pode ter sido ocultada por este confundidor. De facto, concentração média de MMP-9 no soro dos doentes de EM encontrada no presente estudo era inferior ao valor médio registado no grupo de doentes de EM usado no trabalho dos marcadores de

disfunção da BHE. Como já referido anteriormente, a fase da doença em que ocorreu a colheita da amostra foi diferente entre os dois estudos. Acresce que neste trabalho todos os doentes estavam a fazer medicação, maioritariamente terapia de 1ª linha, já durante algum tempo, o que justifica a diminuição dos níveis de MMP-9. Por outro lado, é sabido que os níveis de MMP-9 são mais elevados no início da doença, com tendência para reduzir em fases mais avançadas da mesma, em consequência da menor disfunção da BHE (Bever e Rosenberg 1999; Avolio et al. 2003).

Este é, segundo o nosso conhecimento, o primeiro estudo realizado na população caucasiana Portuguesa que avalia as concentrações séricas da MMP-9 e o polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 em doentes de EM. Embora não tenhamos encontrado qualquer evidência da associação deste polimorfismo com a suscetibilidade à doença ou prognóstico, foi demonstrado um aumento significativo na frequência do alelo T em doentes de EM do sexo feminino. Em última análise, a MMP-9 parece desempenhar um papel importante na fisiopatologia da doença e ser um bom marcador de resposta à terapêutica para doentes de EM tratados com o IFN .

#### **4.6 Limitações ao estudo**

Ao longo da investigação detetámos algumas limitações ao estudo passíveis de induzir alterações nos nossos resultados, e apesar de algumas delas já terem sido referidas ao longo do texto, o que pretendemos agora é sistematizar. A iniciar pelo reduzido número de amostras de controlos neurológicos usadas (de doenças inflamatórias e não inflamatórias do SNC), conduzindo ao desequilíbrio entre os grupos de doentes e controlos. Também o número de doentes de EM deveria ser maior, tendo em conta a heterogeneidade da doença e para obtermos uma divisão mais equilibrada quando fracionamos a população, por exemplo nos vários subtipos clínicos da doença. Ao nível dos marcadores de disfunção da BHE, um fator limitante muito importante foi a reduzida quantidade de amostra, nomeadamente de LCR, impedindo a realização de todos os parâmetros nos mesmos doentes. Uma falha que nos parece essencial, uma vez que, a sua presença poderia explicar alguns mecanismos fisiopatológicos da EM, seria a inclusão de um grupo controlo saudável com amostras de LCR. Contudo, o difícil acesso na colheita e as possíveis complicações tornam esta colheita pouco ética. Acresce um conjunto de outros fatores importantes na avaliação do doente, que indiretamente podem interferir no

estudo, como algum déficit de informação completa na base de dados de origem, por exemplo o cálculo do EDSS em intervalos de tempo irregulares, diferentes clínicos no seguimento dos doentes de EM, falta de padronização nas avaliações, sobretudo no espaço temporal, impedindo uma avaliação temporal igual em todos os casos e, ainda diferentes esquemas terapêuticos podem ter influenciado os resultados da investigação.

Uma questão fundamental neste estudo, que condiciona toda a análise de prognóstico, relaciona-se com o facto de todos os doentes estarem medicados com DMTs. Este facto poderá explicar a ausência de diferenças estatísticas significativas em muitas das nossas análises, pois de facto, nunca foi possível avaliar o curso natural da doença, uma vez que este está sempre a ser modulado pelo efeito da terapêutica.

No estudo do polimorfismo, o reduzido número de doentes de EM e controlos saudáveis analisados na globalidade do trabalho, especialmente para a determinação dos níveis séricos de MMP-9, poderá ter tido um forte impacto na consistência dos resultados e ainda na explicação das discrepâncias em relação à literatura existente. Outra limitação relaciona-se com o desenho do estudo, especificamente com a seleção dos doentes. De facto, se os doentes que participaram no estudo do polimorfismo tivessem sido coincidentes com os que integraram o estudo dos marcadores da BHE, teria sido possível efetuar uma avaliação longitudinal das concentrações de MMP-9, comparando aquando da PL, sem medicação e passados alguns anos, já com medicação. Infelizmente, por questões de conveniência da amostra, apenas 8 doentes eram comuns aos dois estudos, o que impossibilitou este tipo de abordagem. No entanto, a população foi bem caracterizada em relação a variáveis demográficas e clínicas que são conhecidas por influenciar a progressão da doença e possíveis associações com os níveis séricos da MMP-9 e polimorfismo foram completamente exploradas.

Por último, a ausência de informação relativa aos exames de imagem (RM) foi também uma forte limitação deste estudo. Tal informação permitir-nos-ia avaliar a doença como imagiologicamente ativa ou não ativa, o que poderia ser um parâmetro importante de progressão da doença, para complementar a avaliação do valor de prognóstico dos parâmetros bioquímicos avaliados.



## **5 Conclusões**

A heterogeneidade particular da esclerose múltipla foi notória ao longo do trabalho desenvolvido, tornando a obtenção de resultados robustos e consistentes um desafio constante. De facto, a seleção de marcadores que se correlacionem com a atividade e progressão da EM, bem como, com a resposta ao tratamento seriam de grande utilidade para a clínica, proporcionando uma avaliação mais específica e individualizada da doença, auxiliando a otimizar a tomada de decisões terapêuticas. Assim, face aos resultados da nossa investigação parece-nos poder indicar algumas conclusões gerais.

Nos doentes com esclerose múltipla, para além do já reconhecido valor no apoio ao diagnóstico clínico, as bandas oligoclonais IgG no LCR revelaram também um efeito preditivo na evolução da EM. A ausência de bandas oligoclonais do tipo IgG no LCR mostrou uma associação com uma maior incapacidade a longo prazo e a uma maior necessidade em recorrer a terapias de 2<sup>a</sup> linha apontando, portanto, para uma doença mais agressiva. No entanto, em fases iniciais da doença, este marcador poderá ter o efeito preditivo inverso, estando a presença de bandas oligoclonais IgG associada a um valor mais elevado de EDSS ao fim do primeiro ano de doença.

Os nossos resultados apontam para uma baixa prevalência das BOC IgM nos doentes de EM e não permitiram comprovar uma associação robusta entre a presença de BOC IgM e um aumento da incapacidade a longo prazo. Contudo, foram encontradas evidências de um prognóstico menos favorável a curto prazo, com os doentes de EM com BOC IgM positivas a apresentarem uma taxa de surtos superior e maior grau de incapacidade nos primeiros anos da doença.

Relativamente ao estudo dos marcadores de disfunção da barreira hematoencefálica (MMPs, TIMPs e CAMs), os nossos resultados corroboram o envolvimento da ativação de metaloproteinasas e moléculas de adesão na patogénese da EM, sendo que, no caso da MMP-2/TIMP-2 e da E-Seletina, estas parecem ser específicas para esta patologia, enquanto no caso da MMP-9 e sICAM-1, estas parecem ser comuns a outras patologias inflamatórias do SNC. Na relação destes marcadores com a progressão da doença EM, os nossos resultados sugerem que o aumento da expressão da sVCAM-1, e eventualmente

da MMP-2, deverão estar associados a um fenótipo mais agressivo (formas progressivas e valores mais elevados de EDSS), enquanto um aumento da razão MMP-9/TIMP-1 parece estar associado a um menor grau de incapacidade no curso da doença e a um fenótipo do tipo surto-remissão.

Por último, não encontramos qualquer evidência da associação do polimorfismo -1562 C/T no gene da MMP-9 com a suscetibilidade para EM ou com o seu prognóstico. Contudo, demonstrámos um aumento significativo na frequência do alelo T em doentes de EM do sexo feminino, e comprovámos o importante papel que a MMP-9 parece desempenhar na fisiopatologia da doença, parecendo ser um bom marcador de resposta à terapêutica para doentes de EM tratados com o interferão .

Assim, parece-nos que, numa patologia tão heterogénea, este trabalho representa uma mais-valia na tentativa do auxílio laboratorial ao clínico, com vista à melhoria da qualidade de vida do doente de esclerose múltipla.

Face aos resultados, numa perspetiva de continuidade, sugerimos a investigação da ausência das bandas oligoclonais IgG com a progressão da EM explorando, igualmente o efeito das DMTs no prognóstico da EM. Quanto à síntese intratecal de IgM, seria pertinente perceber a percentagem de distribuição e se a sua presença pode funcionar como indicador de pior prognóstico na EM.

A investigação de marcadores de disrupção da BHE seria uma área aliciante a explorar, sobretudo pela sua interação com as DMTs em associação com estudos de imagem para melhor avaliar e relacionar com a atividade da EM.

O desenvolvimento de novos estudos é crucial de forma a melhor responder às questões de uma doença tão complexa e heterogénea como a esclerose múltipla.

## 6 Referências bibliográficas

- Abou-Sleiman, P. M., M. G. Hanna and N. W. Wood (2006). "Genetic association studies of complex neurological diseases." Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry **77**(12): 1302-1304.
- Al-Khamis, F. A. (2016). "The use of immune modulating drugs for the treatment of multiple sclerosis." Neurosciences **21**(1): 4-9.
- Alexander, J. S., M. K. Harris, S. R. Wells, G. Mills, K. Chalamidas, V. C. Ganta, J. McGee, M. H. Jennings, E. Gonzalez-Toledo and A. Minagar (2010). "Alterations in serum MMP-8, MMP-9, IL-12p40 and IL-23 in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b." Mult Scler **16**(7): 801-809.
- Allison, R. S. (1931). "Disseminated sclerosis in North Wales: an inquiry into its incidence, frequency, distribution and other aetiological factors" " Brain **53**(4): 391-430.
- Almeida, L. B. (2010). Esclerose Múltipla: A História de um Longo Enigma. Introdução à Esclerose Múltipla. R. Pedrosa. Lisboa, Biogen Idec: 33-39.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol and A. Prat (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease **1812**(2): 252-264.
- Alves-Leon, S. V., E. Batista, R. Papais-Alvarenga and T. Quirico-Santos (2001). "Determination of soluble ICAM-1 and TNF alpha R in the cerebrospinal fluid and serum levels in a population of Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." Arquivos De Neuro-Psiquiatria **59**(1): 18-22.
- Andersson, M., J. Alvarez-Cermeño, G. Bernardi, I. Cogato, P. Fredman, J. Frederiksen, S. Fredrikson, P. Gallo, L. M. Grimaldi and M. Grønning (1994). "Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report." Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry **57**(8): 897-902.
- Andreadou, E., S. Chatzipanagiotou, V. C. Constantinides, A. Rombos, E. Stamboulis and C. Nicolaou (2013). "Prevalence of cerebrospinal fluid oligoclonal IgG bands in Greek patients with clinically isolated syndrome and multiple sclerosis." Clin Neurol Neurosurg **115**(10): 2094-2098.
- Annunziata, P., A. Giorgio, L. De Santi, V. Zipoli, E. Portaccio, M. P. Amato, R. Clerici, E. Scarpini, G. Moscato, A. Iudice, G. Vacca, G. Orefice, V. B. Morra and D. Maimone (2006). "Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-beta." J Neurol Sci **244**(1-2): 97-102.
- Antel, J., S. Antel, Z. Caramanos, D. L. Arnold and T. Kuhlmann (2012). "Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity?" Acta Neuropathologica **123**(5): 627-638.
- Anthony, D. C., B. Ferguson, M. K. Matyzak, K. M. Miller, M. M. Esiri and V. H. Perry (1997). "Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke." Neuropathology and Applied Neurobiology **23**(5): 406-415.
- Ascherio, A. and K. L. Munger (2007a). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection." Ann Neurol **61**(4): 288-299.
- Ascherio, A. and K. L. Munger (2007b). "Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors." Ann Neurol **61**(6): 504-513.
- Assoc, W. M. (2013). "World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects." Jama-Journal of the American Medical Association **310**(20): 2191-2194.
- Avasarala, J. R., A. H. Cross and J. L. Trotter (2001). "Oligoclonal band number as a marker for prognosis in multiple sclerosis." Archives of Neurology **58**(12): 2044-2045.

- Avolio, C., M. Filippi, C. Tortorella, M. A. Rocca, M. Ruggieri, F. Agosta, V. Tomassini, C. Pozzilli, S. Stecchi, P. Giaquinto, P. Livrea and M. Trojano (2005). "Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment." Mult Scler **11**(4): 441-446.
- Avolio, C., M. Ruggieri, F. Giuliani, G. M. Liuzzi, R. Leante, P. Riccio, P. Livrea and M. Trojano (2003). "Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes." J Neuroimmunol **136**(1-2): 46-53.
- Awad, A., B. Hemmer, H. P. Hartung, B. Kieseier, J. L. Bennett and O. Stuve (2010). "Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **219**(1-2): 1-7.
- Bach, J. F. (2002). "Mechanisms of disease: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases." New England Journal of Medicine **347**(12): 911-920.
- Banks, W. A. (1999). "Physiology and pathology of the blood-brain barrier: implications for microbial pathogenesis, drug delivery and neurodegenerative disorders." Journal of Neurovirology **5**(6): 538-555.
- Bar-Or, A., R. K. Nuttall, M. Duddy, A. Alter, H. J. Kim, I. Ifergan, C. J. Pennington, P. Bourgoin, D. R. Edwards and V. W. Yong (2003). "Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis." Brain **126**: 2738-2749.
- Barcellos, L. F., S. Sawcer, P. P. Ramsay, S. E. Baranzini, G. Thomson, F. Briggs, B. C. A. Cree, A. B. Begovich, P. Villoslada, X. Montalban, A. Uccelli, G. Savettieri, R. R. Lincoln, C. DeLoa, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. Compston, S. L. Hauser and J. R. Oksenberg (2006). "Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis." Human Molecular Genetics **15**(18): 2813-2824.
- Barnett, M. H., J. D. E. Parratt, E. S. Cho and J. W. Prineas (2009). "Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue." Annals of Neurology **65**(1): 32-46.
- Barreiro, O. (2009). "Endothelial Adhesive Platforms Organize Receptors to Promote Leukocyte Extravasation." Leukocyte Adhesion **64**: 277-296.
- Batchelor, J. R., A. Compston and W. I. McDonald (1978). "Significance of Association between Hla and Multiple-Sclerosis." British Medical Bulletin **34**(3): 279-284.
- Batista, S., I. Baldeiras, H. Garrucho, R. Pascoal, C. Casimiro, M. C. Macário, F. Matias and L. Sousa (2007). "Utilidade clínica das bandas oligoclonais no LCR no diagnóstico da esclerose múltipla." Sinapse **7**(2): 87.
- Becker, M., C. Latache, E. Roman, M. Debouverie, C. Malaplate-Armand and F. Guillemin (2015). "No prognostic value of routine cerebrospinal fluid biomarkers in a population-based cohort of 407 multiple sclerosis patients." BMC Neurology **15**: 79.
- Bednarova, J., P. Stourac and P. Adam (2005). "Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis." Acta Neurol Scand **112**(2): 97-102.
- Benesova, Y., A. Vasku, H. Novotna, J. Litzman, P. Stourac, M. Beranek, Z. Kadanka and J. Bednarik (2009). "Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis." Mult Scler **15**(3): 316-322.
- Benesova, Y., A. Vasku, P. Stourac, M. Hladikova, M. Beranek, Z. Kadanka, H. Novotna and J. Bednarik (2008). "Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **205**(1-2): 105-109.
- Benito-Leon, J., E. Martin, L. Vela, M. E. Villar, B. Felgueroso, C. Marrero, A. Guerrero and J. Ruiz-Galiana (1998). "Multiple sclerosis in Mostoles, central Spain." Acta Neurol Scand **98**(4): 238-242.
- Bergman, J., A. Dring, H. Zetterberg, K. Blennow, N. Norgren, J. Gilthorpe, T. Bergenheim and A. Svenningsson (2016). "Neurofilament light in CSF and serum is a sensitive marker for axonal white matter injury in MS." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **3**(5).
- Bertrams, J. and E. Kuwert (1972). "Hl-a Antigen Frequencies in Multiple-Sclerosis - Significant Increase of Hl-A3, Hl-A10 and W5, and Decrease of Hl-A12." European Neurology **7**(1-2): 74-&.

- Bever, C. T. and G. A. Rosenberg (1999). "Matrix metalloproteinases in multiple sclerosis." Neurology **53**(7): 1380.
- Bielekova, B., B. Goodwin, N. Richert, I. Cortese, T. Kondo, G. Afshar, B. Gran, J. Eaton, J. Antel, J. A. Frank, H. F. McFarland and R. Martin (2000). "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand." Nature Medicine **6**(10): 1167-1175.
- Bieniek, M., D. R. Altmann, G. R. Davies, G. T. Ingle, W. Rashid, J. Sastre-Garriga, A. J. Thompson and D. H. Miller (2006). "Cord atrophy separates early primary progressive and relapsing remitting multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **77**(9): 1036-1039.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo and J. A. Engler (1993). "Matrix metalloproteinases: a review." Crit Rev Oral Biol Med **4**(2): 197-250.
- Bitsch, A., J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann and W. Bruck (2000). "Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation." Brain **123** ( Pt 6): 1174-1183.
- Bode, W., C. Fernandez-Catalan, H. Nagase and K. Maskos (1999). "Endoproteinase-protein inhibitor interactions." APMIS **107**(1): 3-10.
- Bonda, D. J., X. L. Wang, G. Perry, A. Nunomura, M. Tabaton, X. W. Zhu and M. A. Smith (2010). "Oxidative stress in Alzheimer disease: A possibility for prevention." Neuropharmacology **59**(4-5): 290-294.
- Borkakoti, N. (1998). "Matrix metalloproteinases: variations on a theme." Prog Biophys Mol Biol **70**(1): 73-94.
- Bosca, I., M. J. Magraner, F. Coret, J. C. Alvarez-Cermeno, M. Simo-Castello, L. M. Villar and B. Casanova (2010). "The risk of relapse after a clinically isolated syndrome is related to the pattern of oligoclonal bands." J Neuroimmunol **226**(1-2): 143-146.
- Bourre, B., H. Zephir, J. C. Ongagna, C. Cordonnier, N. Collongues, S. Debette, M. C. Fleury, O. Outteryck, D. Hannequin, P. Vermersch and J. de Seze (2012). "Long-term Follow-up of Acute Partial Transverse Myelitis." Archives of Neurology **69**(3): 357-362.
- Boz, C., M. Ozmenoglu, S. Velioglu, K. Kilinc, A. Orem, Z. Alioglu and V. Altunayoglu (2006). "Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with interferon beta." Clinical neurology and neurosurgery **108**(2): 124-128.
- Bramow, S., J. M. Frischer, H. Lassmann, N. Koch-Henriksen, C. F. Lucchinetti, P. S. Sorensen and H. Laursen (2010). "Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis." Brain **133**: 2983-2998.
- Brew, K., D. Dinakarpanian and H. Nagase (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." Biochim Biophys Acta **1477**(1-2): 267-283.
- Brucklacher-Waldert, V., K. Stürner, M. Kolster, J. Wolthausen and E. Tolosa (2009). "Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 12): 3329-3341.
- Buckle, G. J., P. Hollsberg and D. A. Hafler (2003). "Activated CD8+ T cells in secondary progressive MS secrete lymphotoxin." Neurology **60**(4): 702-705.
- Bulman, D. E. a. E., G.C. (1992). "The geography of MS reflects geneticsusceptibility." Journal of Tropical and Geographical Neurology **2**: 66-72.
- Casetta, I., E. Granieri, S. Malagu, M. R. Tola, E. Paolino, L. M. Caniatti, V. Govoni, V. C. Monetti and E. Fainardi (1994). "Environmental risk factors and multiple sclerosis: a community-based, case-control study in the province of Ferrara, Italy." Neuroepidemiology **13**(3): 120-128.
- Cassan, C. and R. S. Liblau (2007). "Immune tolerance and control of CNS autoimmunity: from animal models to MS patients." J Neurochem **100**(4): 883-892.
- Caudie, C., O. Allauzen, J. Bancel and R. Later (2000). "Role of isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G in the early biological assessment of multiple sclerosis." Ann Biol Clin **58**(2): 187-193.

- Chan, W. W. C. (1977). "Eskimos and Multiple-Sclerosis." *Lancet* **1**(8026): 1370-1370.
- Chao, M. J., M. C. N. M. Barnardo, M. R. Lincoln, S. V. Ramagopalan, B. M. Herrera, D. A. Dymont, A. Montpetit, A. D. Sadovnick, J. C. Knight and G. C. Ebers (2008). "HLA class I alleles tag HLA-DRB1\*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(35): 13069-13074.
- Chastain, E. M. L., D. A. S. Duncan, J. M. Rodgers and S. D. Miller (2011). "The Role of Antigen Presenting Cells in Multiple Sclerosis." *Biochim Biophys Acta* **1812**(2): 265-274.
- Ciccarelli, O., F. Barkhof, B. Bodini, N. De Stefano, X. Golay, K. Nicolay, D. Pelletier, P. J. Pouwels, S. A. Smith, C. A. Wheeler-Kingshott, B. Stankoff, T. Yousry and D. H. Miller (2014). "Pathogenesis of multiple sclerosis: insights from molecular and metabolic imaging." *Lancet Neurol* **13**(8): 807-822.
- Clark, I. M., T. E. Swingle, C. L. Sampieri and D. R. Edwards (2008). "The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(6-7): 1362-1378.
- Cohen, J. A., F. Barkhof, G. Comi, H. P. Hartung, B. O. Khatri, X. Montalban, J. Pelletier, R. Capra, P. Gallo, G. Izquierdo, K. Tiel-Wilck, A. de Vera, J. Jin, T. Stites, S. Wu, S. Aradhye and L. Kappos (2010). "Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **362**(5): 402-415.
- Cohen, J. A., A. J. Coles, D. L. Arnold, C. Confavreux, E. J. Fox, H. P. Hartung, E. Havrdova, K. W. Selmaj, H. L. Weiner, E. Fisher, V. V. Brinar, G. Giovannoni, M. Stojanovic, B. I. Ertik, S. L. Lake, D. H. Margolin, M. A. Panzara, D. A. S. Compston and C.-M. I. Investigators (2012). "Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial." *Lancet* **380**(9856): 1819-1828.
- Cohen, J. I. (2000). "Epstein-Barr virus infection." *New England Journal of Medicine* **343**(7): 481-492.
- Coles, A. J., C. L. Twyman, D. L. Arnold, J. A. Cohen, C. Confavreux, E. J. Fox, H. P. Hartung, E. Havrdova, K. W. Selmaj, H. L. Weiner, T. Miller, E. Fisher, R. Sandbrink, S. L. Lake, D. H. Margolin, P. Oyuela, M. A. Panzara, D. A. S. Compston and C.-M. I. Investigators (2012). "Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial." *Lancet* **380**(9856): 1829-1839.
- Collier, I. E., J. Smith, A. Kronberger, E. A. Bauer, S. M. Wilhelm, A. Z. Eisen and G. I. Goldberg (1988). "The Structure of the Human-Skin Fibroblast Collagenase Gene." *Journal of Biological Chemistry* **263**(22): 10711-10713.
- Comabella, M., J. Rio, C. Espejo, M. Ruiz de Villa, H. Al-Zayat, C. Nos, F. Deisenhammer, S. E. Baranzini, L. Nonell, C. Lopez, E. Julia, J. R. Oksenberg and X. Montalban (2009). "Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors during interferon-beta treatment in multiple sclerosis." *Clinical Immunology* **130**(2): 145-150.
- Comi, G., M. Filippi, F. Barkhof, L. Durelli, G. Edan, O. Fernandez, H. P. Hartung, P. Seeldrayers, P. S. Sorensen, M. Rovaris, V. Martinelli, O. R. Hommes and E. T. M. Sclerosis (2001b). "Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study." *Lancet* **357**(9268): 1576-1582.
- Comi, G., M. Filippi, J. S. Wolinsky and E. C. G. Aceta (2001a). "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." *Annals of Neurology* **49**(3): 290-297.
- Comi, G., V. Martinelli, M. Rodegher, L. Moiola, O. Bajenaru, A. Carra, I. Elovaara, F. Fazekas, H. P. Hartung, J. Hillert, J. King, S. Komoly, C. Lubetzki, X. Montalban, K. M. Myhr, M. Ravnborg, P. Rieckmann, D. Wynn, C. Young and M. Filippi (2009). "Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISE study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial." *Lancet* **374**(9700): 1503-1511.
- Compston, A. (1994). "The epidemiology of Multiple-Sclerosis - Principles, achievements, and recommendations." *Annals of Neurology* **36**: S211-S217.
- Compston, A. and A. Coles (2002). "Multiple sclerosis." *The Lancet* **359**(9313): 1221-1231.

- Confavreux, C., P. O'Connor, G. Comi, M. S. Freedman, A. E. Miller, T. P. Olsson, J. S. Wolinsky, T. Bagulho, J. L. Delhay, D. Dukovic, P. Truffinet and L. Kappos (2014). "Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial." Lancet Neurol **13**(3): 247-256.
- Confavreux, C., S. Vukusic, T. Moreau and P. Adeleine (2000). "Relapses and progression of disability in multiple sclerosis." New England Journal of Medicine **343**(20): 1430-1438.
- Contentti, E. C., J. P. Hryb, F. Leguizamon, J. L. Di Pace, J. Celso, E. Knorre and M. B. Perassolo (2017). "Differential diagnosis and prognosis for longitudinally extensive myelitis in Buenos Aires, Argentina." Neurologia **32**(2): 99-105.
- Correale, J. and L. Bassani Molinas Mde (2003). "Temporal variations of adhesion molecules and matrix metalloproteinases in the course of MS." J Neuroimmunol **140**(1-2): 198-209.
- Cossins, J. A., J. M. Clements, J. Ford, K. M. Miller, R. Pigott, W. Vos, P. Van der Valk and C. J. De Groot (1997). "Enhanced expression of MMP-7 and MMP-9 in demyelinating multiple sclerosis lesions." Acta Neuropathol **94**(6): 590-598.
- Craner, M. J., J. Newcombe, J. A. Black, C. Hartle, M. L. Cuzner and S. G. Waxman (2004). "Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8168-8173.
- Cunusamy, K., E. J. Baughman, J. Franco, S. B. Ortega, S. Sinha, P. Chaudhary, B. M. Greenberg, E. M. Frohman and N. J. Karandikar (2014). "Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8<sup>+</sup>T cells." Clinical Immunology **152**(1-2): 115-126.
- Cuzner, M. L., D. Gveric, C. Strand, A. J. Loughlin, L. Paemen, G. Opdenakker and J. Newcombe (1996). "The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: Comparison of stages in lesion evolution." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **55**(12): 1194-1204.
- Cuzner, M. L. and W. T. Norton (1996). "Biochemistry of demyelination." Brain Pathology **6**(3): 231-242.
- Dargahi, N., M. Katsara, T. Tselios, M. E. Androutsou, M. de Courten, J. Matsoukas and V. Apostolopoulos (2017). "Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update." Brain Sci **7**(7).
- De Sa, J., E. Alcalde-Cabero, J. Almazan-Isla, F. Garcia-Lopez and J. de Pedro-Cuesta (2014). "Incidence of multiple sclerosis in Northern Lisbon, Portugal: 1998-2007." Bmc Neurology **14**.
- De Sa, J., E. Alcalde-Cabero, J. Almazan-Isla, A. Sempere and J. de Pedro-Cuesta (2012). "Capture-recapture as a potentially useful procedure for assessing prevalence of multiple sclerosis: methodologic exercise using Portuguese data." Neuroepidemiology **38**(4): 209-216.
- De Sa, J., A. Paulos, H. Mendes, J. Becho, J. Marques and J. Roxo (2006). "The prevalence of multiple sclerosis in the District of Santarem, Portugal." J Neurol **253**(7): 914-918.
- De Vries, G. H., W. J. Zetusky, C. Zmachinski and V. P. Calabrese (1981). "Lipid-composition of axolemma-enriched fractions from human brains." J Lipid Res **22**(2): 208-216.
- Dean, G. (1967). "Annual incidence prevalence and mortality of multiple sclerosis in white South-African-Born and in white immigrants to South Africa." British Medical Journal **2**(5554): 724-&.
- Denic, A., B. Wootla and M. Rodriguez (2013). "CD8(+) T Cells in Multiple Sclerosis." Expert opinion on therapeutic targets **17**(9): 1053-1066.
- Dhib-Jalbut, S. and S. Marks (2010). "Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis." Neurology **5**(74).
- Dobson, R., S. Ramagopalan, A. Davis and G. Giovannoni (2013). "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 **84**(8): 909-914.

- Dodelet-Devillers, A., R. Cayrol, J. Horssen, A. S. Haqqani, H. E. de Vries, B. Engelhardt, J. Greenwood and A. Prat (2009). "Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier." Journal of Molecular Medicine-Jmm **87**(8): 765-774.
- Droogan, A. G., S. A. McMillan, J. P. Douglas and S. A. Hawkins (1996). "Serum and cerebrospinal fluid levels of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: predominant intrathecal release of vascular cell adhesion molecule-1." J Neuroimmunol **64**(2): 185-191.
- Du Pasquier, R. A., D. D. Pinschewer and D. Merkler (2014). "Immunological mechanism of action and clinical profile of disease-modifying treatments in multiple sclerosis." CNS Drugs **28**(6): 535-558.
- Duran, I., E. M. Martinez-Caceres, J. Rio, N. Barbera, M. E. Marzo and X. Montalban (1999). "Immunological profile of patients with primary progressive multiple sclerosis - Expression of adhesion molecules." Brain **122**: 2297-2307.
- Durante, L., W. Zaaroui, A. Rico, L. Crespy, D. Wybrecht, A. Faivre, F. Reuter, I. Malikova, G. Pommier, S. Confort-Gouny, P. J. Cozzone, J. P. Ranjeva, J. Pelletier, J. Boucraut and B. Audoin (2012). "Intrathecal synthesis of IgM measured after a first demyelinating event suggestive of multiple sclerosis is associated with subsequent MRI brain lesion accrual." Multiple Sclerosis **18**(5): 587-591.
- Durelli, L., D. Cocito, A. Riccio, C. Barile, B. Bergamasco, G. F. Baggio, F. Perla, M. Delsedime, G. Gusmaroli and L. Bergamini (1986). "High-dose intravenous methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis: clinical-immunologic correlations." Neurology **36**(2): 238-243.
- Durelli, L., L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid and F. Novelli (2009). "T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta." Ann Neurol **65**(5): 499-509.
- Dyment, D. A., G. C. Ebers and A. D. Sadovnick (2004). "Genetics of multiple sclerosis." Lancet Neurol **3**(2): 104-110.
- Ebers, G. C. (2008). "Environmental factors and multiple sclerosis." Lancet Neurol **7**(3): 268-277.
- Ebers, G. C. and M. Daumer (2008). "Natural history of MS." European Journal of Neurology **15**(9): 881-882.
- Ebers, G. C., G. Rice, J. Lesaux, D. Paty, J. Oger, D. K. B. Li, S. Beall, V. Devonshire, S. Hashimoto, J. Hooge, L. Kastrukoff, C. Krieger, M. Mezei, P. Seland, G. Vorobeychi, W. Morrison, J. Nelson, M. S. Freedman, S. Chrisie, R. Nelson, H. Rabinovitch, C. Freedman, H. P. Hartung, P. Rieckmann, J. Archelos, S. Jung, F. Weilbach, P. Flachenecke, J. Sauer, O. Hommes, P. Jongen, S. Brouwer, J. McLeod, J. Pollard, R. Ng, M. Sandberg-Wollheim, K. Kallen, P. Nilsson, R. Ekberg, A. Lundgren, G. Jadbak, J. Wikstrom, J. Multanen, M. Valjakka, H. Carton, F. Lissioir, I. Declerq, M. Vieren, E. Peeters, B. Dubois, E. Dekeersmaeker, A. Van Herle, R. A. C. Hughes, B. Sharrack, S. Soudain, M. Panelius, J. Eralinna, M. Soilu-Hanninen, S. Murto, R. Medaer, J. Broeckx, E. Vanroose, A. Bogaers, L. D. Blumhardt, S. Edwards, C. Liu, V. Orpe, D. Barnes, M. Schwartz, N. Stoy, C. Harraghy, F. Bertelsmann, B. Uitdehaag, K. Nasser, M. Chofflon, S. Roth, L. Kappos, S. Huber, Y. Bellaiche, C. Senn, J. King, J. Jubert, S. Whitten, J. M. Newsom-Davis, J. Palace, M. Lee, N. Evangelou, A. Pinto, A. Cavey, C. J. M. Sindic, P. Monteyne, D. Verougstraete, P. A. Van Doorn, W. Moll, L. Visser, M. Willems, I. Martina, D. Buljevac, L. Loman, D. Bates, D. Pandit, J. Irving, B. Rhodes, A. Riddehough, G. J. Zhao, X. Wang, Y. Cheng, N. Ammoury, F. Dupont, A. Galazka, R. Hyde, M. Olson, M. O. Pernin, A. K. Abdul-Ahad, O. Hommes, J. Noseworthy, E. Borden, P. O'Brien, J. Wolinsky and P. S. Grp (1998). "Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis." Lancet **352**(9139): 1498-1504.
- Ebers, G. C. and A. D. Sadovnick (1993). "The Geographic-distribution of multiple-sclerosis - a review." Neuroepidemiology **12**(1): 1-5.

- Ebers, G. C., A. D. Sadovnick, D. A. Dymont, I. M. L. Yee, C. J. Willer and N. Risch (2004). "Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings." Lancet **363**(9423): 1773-1774.
- Elovaara, I., M. Ukkonen, M. Leppakynnas, T. Lehtimäki, M. Luomala, J. Peltola and P. Dastidar (2000). "Adhesion molecules in multiple sclerosis: relation to subtypes of disease and methylprednisolone therapy." Arch Neurol **57**(4): 546-551.
- Emerson, E. (2010). "Hardy-Weinberg equilibrium calculator for 2 alleles." from <http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>.
- English, C. and J. J. Aloï (2015). "New FDA-Approved Disease-Modifying Therapies for Multiple Sclerosis." Clin Ther **37**(4): 691-715.
- Espino, M., V. Abaira, R. Arroyo, L. Bau, C. Camara, L. Campos-Ruiz, B. Casanova, C. Espejo, O. Fernandez, A. Garcia-Merino, M. I. Garcia-Sanchez, M. Gomez, A. Gosis, G. Izquierdo, J. Meca, X. Montalban, F. Morandeira, J. Olascoaga, A. Prada, E. Quintana, L. Ramio-Torrenta, A. Rodriguez-Antiguedad, G. Salgado, J. L. Santiago, E. Sarasola, M. Simo-Castello, J. C. Alvarez-Cermenó and L. M. Villar (2015). "Assessment of the reproducibility of oligoclonal IgM band detection for its application in daily clinical practice." Clin Chim Acta **438**: 67-69.
- Fainardi, E., M. Castellazzi, C. Tamborino, A. Trentini, M. C. Manfrinato, E. Baldi, M. R. Tola, F. Dalocchio, E. Granieri and T. Bellini (2009). "Potential relevance of cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal synthesis of active matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as markers of disease remission in patients with multiple sclerosis." Mult Scler **15**(5): 547-554.
- Falip, M., M. Tintore, R. Jardí, I. Duran, H. Link and X. Montalban (2001). "Clinical usefulness of oligoclonal bands." Rev Neurol **32**(12): 1120-1124.
- Farber, R. S., A. Harel and F. Lublin (2016). "Novel agents for relapsing forms of Multiple Sclerosis." Annual Review of Medicine, Vol 67 **67**: 309-321.
- Fernandes, K. S., D. G. Brum, A. C. Palei, V. C. Sandrim, C. T. Guerreiro, J. E. Tanus-Santos and A. A. Barreira (2012). "Functional MMP-9 polymorphisms modulate plasma MMP-9 levels in multiple sclerosis patients." J Neuroimmunol **249**(1-2): 56-59.
- Fernandes, K. S., D. G. Brum, V. C. Sandrim, C. T. Guerreiro, A. A. Barreira and J. E. Tanus-Santos (2009). "Matrix metalloproteinase-9 genotypes and haplotypes are associated with multiple sclerosis and with the degree of disability of the disease." J Neuroimmunol **214**(1-2): 128-131.
- Ferrante, P., P. Castellani, M. Barbi and F. Bergamini (1987). "The Italian Cooperative Multiple-Sclerosis Case-Control Study - Preliminary-Results on Viral Antibodies." Italian Journal of Neurological Sciences(3): 45-50.
- Ferraro, D., A. M. Simone, R. Bedin, V. Galli, F. Vitetta, L. Federzoni, R. D'Amico, E. Merelli, P. F. Nichelli and P. Sola (2013). "Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with Clinically Isolated Syndrome." Journal of Neuroimmunology **257**(1-2): 76-81.
- Ferraro, D., A. M. Simone, R. Bedin, F. Vitetta, V. Camera, P. F. Nichelli and P. Sola (2017). "Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands and prognosis in multiple sclerosis patients: pooled long-term follow-up data." ECTRIMS On line Library.
- Ferreira, Z., S. Seixas, A. M. Andres, W. W. Kretzschmar, J. C. Mullikin, P. F. Cherukuri, P. Cruz, W. J. Swanson, A. G. Clark, E. D. Green, B. Hurlé and N. C. Sequencing (2013). "Reproduction and Immunity-Driven Natural Selection in the Human WFDC Locus." Mol Biol Evol **30**(4): 938-950.
- Filbin, M. T. (2003). "Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS." Nature Reviews Neuroscience **4**(9): 703-713.
- Filippi, M. and M. A. Rocca (2005). 15 - MRI-Clinical Correlations in Multiple Sclerosis: Implications for Our Understanding of Neuronal Changes A2 - Waxman, Stephen G. Multiple Sclerosis As A Neuronal Disease. Burlington, Academic Press: 215-225.
- Filippi, M. and M. A. Rocca (2011). "MR imaging of multiple sclerosis." Radiology **259**(3): 659-681.

- Fiotti, N., R. Zivadinov, N. Altamura, D. Nasuelli, A. Bratina, M. A. Tommasi, A. Bosco, L. Locatelli, A. Grop, G. Cazzato, G. Guarnieri, C. Giansante and M. Zorzon (2004). "MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis." J Neuroimmunol **152**(1-2): 147-153.
- Firth, D. (1941). "The Case of Augustus d'Este (1794-1848): The First Account of Disseminated Sclerosis: (Section of the History of Medicine)." Proceedings of the Royal Society of Medicine **34**(7): 381-384.
- Fischer, M. T., R. Sharma, J. L. Lim, L. Haider, J. M. Frischer, J. Drexhage, D. Mahad, M. Bradl, J. van Horssen and H. Lassmann (2012). "NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury." Brain **135**(Pt 3): 886-899.
- Fleming, J. O. and T. D. Cook (2006). "Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis." Neurology **67**(11): 2085-2086.
- Fletcher, J. M., S. J. Lalor, C. M. Sweeney, N. Tubridy and K. H. G. Mills (2010). "T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Clinical and Experimental Immunology **162**(1): 1-11.
- Fortini, A. S., E. L. Sanders, B. G. Weinshenker and J. A. Katzmann (2003). "Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index." Am J Clin Pathol **120**(5): 672-675.
- Freedman, D. M., H. Dosemeci and M. C. R. Alavanja (2000). "Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case-control study based on death certificates." Occup Environ Med **57**(6): 418-421.
- Fridman, R., M. Toth, D. Pena and S. Mobashery (1995). "Activation of Progelatinase-B (Mmp-9) by Gelatinase-a (Mmp-2)." Cancer Res **55**(12): 2548-2555.
- Frohman, E. M., M. Filippi, O. Stuve, S. G. Waxman, J. Corboy, J. T. Phillips, C. Lucchinetti, J. Wilken, N. Karandikar, B. Hemmer, N. Monson, J. De Keyser, H. Hartung, L. Steinman, J. R. Oksenberg, B. A. Cree, S. Hauser and M. K. Racke (2005). "Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions." Arch Neurol **62**(9): 1345-1356.
- Frohman, E. M., M. K. Racke and C. S. Raine (2006). "Medical progress: Multiple sclerosis - The plaque and its pathogenesis." New England Journal of Medicine **354**(9): 942-955.
- Fukazawa, T., S. Kikuchi, H. Sasaki, K. Hamada, T. Hamada, K. Miyasaka and K. Tashiro (1998). "The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis in Japan: relevance of immunogenetic backgrounds." J Neurol Sci **158**(2): 209-214.
- Fumagalli, S., C. Perego, F. Pischiutta, E. R. Zanier and M.-G. De Simoni (2015). "The Ischemic Environment Drives Microglia and Macrophage Function." Frontiers in Neurology **6**: 81.
- Galboiz, Y., S. Shapiro, N. Lahat, H. Rawashdeh and A. Miller (2001). "Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis patients." Annals of Neurology **50**(4): 443-451.
- Gale, C. R. and C. N. Martyn (1995). "Migrant studies in multiple sclerosis." Prog Neurobiol **47**(4-5): 425-448.
- Garcia-Barragan, N., L. M. Villar, M. Espino, M. C. Sadaba, P. Gonzalez-Porque and J. C. Alvarez-Cermenon (2009). "Multiple sclerosis patients with anti-lipid oligoclonal IgM show early favourable response to immunomodulatory treatment." European Journal of Neurology **16**(3): 380-385.
- Genain, C. P., B. Cannella, S. L. Hauser and C. S. Raine (1999). "Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis." Nature Medicine **5**(2): 170-175.
- Gerlach, R. F., C. Demacq, K. Jung and J. E. Tanus-Santos (2007). "Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma." Clinical Biochemistry **40**(1-2): 119-123.
- Gerlach, R. F., C. A. Meschiari, A. M. Marcaccini, A. C. Palei, V. C. Sandrim, R. C. Cavalli and J. E. Tanus-Santos (2009). "Positive correlations between serum and plasma matrix

- metalloproteinase (MMP)-2 or MMP-9 levels in disease conditions." Clin Chem Lab Med **47**(7): 888-891.
- Gijbels, K., S. Masure, H. Carton and G. Opdenakker (1992). "Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders." J Neuroimmunol **41**(1): 29-34.
- Giovannoni, G., S. J. Heales, J. M. Land and E. J. Thompson (1998). "The potential role of nitric oxide in multiple sclerosis." Mult Scler **4**(3): 212-216.
- Giovannoni, G., M. Lai, J. Thorpe, D. Kidd, V. Chamoun, A. J. Thompson, D. H. Miller, M. Feldmann and E. J. Thompson (1997). "Longitudinal study of soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: Correlation with gadolinium enhanced magnetic resonance Imaging." Neurology **48**(6): 1557-1565.
- Giovannoni, G., J. W. Thorpe, D. Kidd, B. E. Kendall, I. F. Moseley, A. J. Thompson, G. Keir, D. H. Miller, M. Feldmann and E. J. Thompson (1996). "Soluble E-selectin in multiple sclerosis: raised concentrations in patients with primary progressive disease." J Neurol Neurosurg Psychiatry **60**(1): 20-26.
- Gold, R., L. Kappos, D. L. Arnold, A. Bar-Or, G. Giovannoni, K. Selmaj, C. Tornatore, M. T. Sweetser, M. Yang, S. I. Sheikh and K. T. Dawson (2012). "Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **367**(12): 1098-1107.
- Gold, R. and J. S. Wolinsky (2011). "Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide." Acta Neurologica Scandinavica **124**(2): 75-84.
- Goldacre, M. J., V. Seagroatt, D. Yeates and E. D. Acheson (2004). "Skin cancer in people with multiple sclerosis: a record linkage study." Journal of Epidemiology and Community Health **58**(2): 142-144.
- Gomes, M. D. and E. Engelhardt (2013). "Jean-Martin Charcot, father of modern neurology: an homage 120 years after his death." Arquivos De Neuro-Psiquiatria **71**(10): 815-817.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji and U. P. Thorgeirsson (1997). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions." European Journal of Cell Biology **74**(2): 111-122.
- Granieri, E., I. Casetta, V. Govoni, M. R. Tola, D. Marchi, S. B. Murgia, A. Ticca, M. Pugliatti, B. Murgia and G. Rosati (2000). "The increasing incidence and prevalence of MS in a Sardinian province." Neurology **55**(6): 842-847.
- Granieri, E., S. Malagu, I. Casetta, M. R. Tola, V. Govoni, E. Paolino and V. C. Monetti (1996). "Multiple sclerosis in Italy - A reappraisal of incidence and prevalence in Ferrara." Archives of Neurology **53**(8): 793-798.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, B. Lassegue and M. Ushio-Fukai (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology **20**(10): 2175-2183.
- group, T. I. m. s. s. (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **43**(4): 655-661.
- Gunnarsson, M., C. Malmstrom, M. Axelsson, P. Sundstrom, C. Dahle, M. Vrethem, T. Olsson, F. Piehl, N. Norgren, L. Rosengren, A. Svenningsson and J. Lycke (2011). "Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab." Ann Neurol **69**(1): 83-89.
- Haahr, S., A. M. Plesner, B. F. Vestergaard and P. Hollsberg (2004). "A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis." Acta Neurol Scand **109**(4): 270-275.
- Haarmann, A., E. Nowak, A. Deiss, S. van der Pol, C. M. Monoranu, G. Kooij, N. Muller, P. van der Valk, G. Stoll, H. E. de Vries, F. Berberich-Siebelt and M. Buttmann (2015). "Soluble VCAM-1 impairs human brain endothelial barrier integrity via integrin alpha-4-transduced outside-in signalling." Acta Neuropathol **129**(5): 639-652.
- Hafler, D. A. (2004). "Multiple sclerosis." J Clin Invest **113**(6): 788-794.
- Hafler, D. A., A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser

- (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." N Engl J Med **357**(9): 851-862.
- Hafner, D. A., J. M. Slavik, D. E. Anderson, K. C. O'Connor, P. De Jager and C. Baecher-Allan (2005). "Multiple sclerosis." Immunological Reviews **204**: 208-231.
- Haines, J. L., H. A. Terwedow, K. Burgess, M. A. Pericak-Vance, J. B. Rimmler, E. R. Martin, J. R. Oksenberg, R. Lincoln, D. Y. Zhang, D. R. Banatao, N. Gatto, D. E. Goodkin and S. L. Hauser (1998). "Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity." Human Molecular Genetics **7**(8): 1229-1234.
- Hakansson, I., A. Tisell, P. Cassel, K. Blennow, H. Zetterberg, P. Lundberg, C. Dahle, M. Vrethem and J. Ernerudh (2017). "Neurofilament light chain in cerebrospinal fluid and prediction of disease activity in clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis." Eur J Neurol **24**(5): 703-712.
- Hartung, H. P., J. J. Archelos, J. Zielasek, R. Gold, M. Koltzenburg, K. H. Reiners and K. V. Toyka (1995). "Circulating Adhesion Molecules and Inflammatory Mediators in Demyelination - a Review." Neurology **45**(6): S22-S32.
- Hartung, H. P., M. Michels, K. Reiners, P. Seeltrayers, J. J. Archelos and K. V. Toyka (1993). "Soluble Icam-1 Serum Levels in Multiple-Sclerosis and Viral Encephalitis." Neurology **43**(11): 2331-2335.
- Hartung, H. P., K. Reiners, J. J. Archelos, M. Michels, P. Seeltrayers, F. Heidenreich, K. W. Pflughaupt and K. V. Toyka (1995). "Circulating adhesion molecules and tumor-necrosis-factor receptor in multiple-sclerosis - Correlation with Magnetic-Resonance-Imaging." Annals of Neurology **38**(2): 186-193.
- Hauser, S. L. and J. R. Oksenberg (2006). "The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration." Neuron **52**(1): 61-76.
- Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould and C. H. Smith (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.
- Hemmer, B., J. J. Archelos and H. P. Hartung (2002). "New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis." Nature Reviews Neuroscience **3**(4): 291-301.
- Hernandez-Pedro, N. Y., G. Espinosa-Ramirez, V. P. de la Cruz, B. Pineda and J. Sotelo (2013). "Initial Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis: Innate Immune Response." Clin Dev Immunol.
- Hoftberger, R., F. Aboul-Enein, W. Brueck, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, M. Schmidbauer, K. Jellinger and H. Lassmann (2004). "Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions." Brain Pathology **14**(1): 43-50.
- Høglund, R. A. and A. A. Maghazachi (2014). "Multiple sclerosis and the role of immune cells." World Journal of Experimental Medicine **4**(3): 27-37.
- Holman, D. W., R. S. Klein and R. M. Ransohoff (2011). "The Blood-Brain Barrier, Chemokines and Multiple Sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 220-230.
- Honce, J. M., L. Nagae and E. Nyberg (2015). "Neuroimaging of Natalizumab Complications in Multiple Sclerosis: PML and Other Associated Entities." Mult Scler Int **2015**: 14.
- Hughes, L. E., P. A. Smith, S. Bonell, R. S. Natt, C. Wilson, T. Rashid, S. Amor, E. J. Thompson, J. Croker and A. Ebringer (2003). "Cross-reactivity between related sequences found in *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis." Journal of Neuroimmunology **144**(1-2): 105-115.
- Hulkkonen, J., M. Pertovaara, J. Antonen, A. Pasternack, M. Hurme, P. Pollanen and T. Lehtimäki (2004). "Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) gene polymorphism and MMP-9 plasma levels in primary Sjogren's syndrome." Rheumatology (Oxford) **43**(12): 1476-1479.
- Huseby, E. S., P. G. Huseby, S. Shah, R. Smith and B. D. Stadinski (2012). "Pathogenic CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Experimental Models." Frontiers in Immunology **3**: 64.

- Idiman, E., S. Ozakbas, Y. Dogan and G. Kosehasanogullari (2009). "The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis: relevance of demographic and clinical features, and immunogenetic backgrounds." *J Neuroimmunol* **212**(1-2): 121-124.
- Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour and A. Prat (2011). "Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin." *Brain* **134**(Pt 12): 3560-3577.
- Ifergan, I., H. Kebir, M. Bernard, K. Wosik, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, N. Arbour and A. Prat (2008). "The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells." *Brain* **131**(Pt 3): 785-799.
- Imitola, J. and S. J. Houry (2006). "Immune regulation of neural stem cell programs: The emerging concept of regenerative neuroimmunology." *Current Topics in Neuroimmunology*: 189-194.
- Irvine, K. A. and W. F. Blakemore (2008). "Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration." *Brain* **131**(Pt 6): 1464-1477.
- Islam, K. T. S., J. W. Gauderman, W. Cozen and T. M. Mack (2006). "Childhood sun-exposure modifies risk of multiple sclerosis among monozygotic twin." *Annals of Neurology* **60**: S38-S38.
- Iwanowski, P. and J. Losy (2015). "Immunological differences between classical phenotypes of multiple sclerosis." *Journal of the Neurological Sciences* **349**(1-2): 10-14.
- Jacobs, L. D. (1996). "Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis (vol 39, pg 285, 1996)." *Annals of Neurology* **40**(3): 480-480.
- Jacobs, L. D., R. W. Beck, J. H. Simon, R. P. Kinkel, C. M. Brownschidle, T. J. Murray, N. A. Simonian, P. J. Slasor, A. W. Sandrock and t. C. S. Group (2000). "Intramuscular Interferon Beta-1A therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis." *New England Journal of Medicine* **343**(13): 898-904.
- Jäger, A. and V. K. Kuchroo (2010). "Effector and regulatory T cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation." *Scandinavian journal of immunology* **72**(3): 173-184.
- Janssen, J. C., A. K. Godbolt, P. Ioannidis, E. J. Thompson and M. N. Rossor (2004). "The prevalence of oligoclonal bands in the CSF of patients with primary neurodegenerative dementia." *Journal of Neurology* **251**(2): 184-188.
- Jesse, S., J. Brettschneider, S. D. Süßmuth, B. G. Landwehrmeyer, C. A. F. von Arnim, A. C. Ludolph, H. Tumani and M. Otto (2011). "Summary of cerebrospinal fluid routine parameters in neurodegenerative diseases." *Journal of Neurology* **258**(6): 1034-1041.
- Joseph, F. G., C. L. Hirst, T. P. Pickersgill, Y. Ben-Shlomo, N. P. Robertson and N. J. Scolding (2009). "CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **80**(3): 292-296.
- Kalinowska-Lyszczarz, A., S. Michalak, M. A. Pawlak, J. Losy and W. Kozubski (2016). "Serum sPECAM-1 and sVCAM-1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis in patients with optic neuritis." *J Neuroimmunol* **300**: 11-14.
- Kamata, H., T. Manabe, J. Kakuta, S. I. Oka and H. Hirata (2002). "Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NF kappa B: Effects of N-acetylcysteine and H2O2 on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and I kappa B kinases." *Cell Signaling, Transcription, and Translation as Therapeutic Targets* **973**: 419-422.
- Kantarci, O. and D. Wingerchuk (2006). "Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights." *Current Opinion in Neurology* **19**(3): 248-254.
- Kappos, L., C. H. Polman, M. S. Freedman, G. Edan, H. P. Hartung, D. H. Miller, X. Montalban, F. Barkhof, L. Bauer, P. Jakobs, C. Pohl and R. Sandbrink (2006). "Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes." *Neurology* **67**(7): 1242-1249.
- Kappos, L., E. W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson and P. Burtin (2010). "A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **362**(5): 387-401.

- Kawasaki, Y., Z. Z. Xu, X. Wang, J. Y. Park, Z. Y. Zhuang, P. H. Tan, Y. J. Gao, K. Roy, G. Corfas, E. H. Lo and R. R. Ji (2008). "Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain." *Nature Medicine* **14**(3): 331-336.
- Keegan, M., A. A. Pineda, R. L. McClelland, C. H. Darby, M. Rodriguez and B. G. Weinschenker (2002). "Plasma exchange for severe attacks of CNS demyelination: predictors of response." *Neurology* **58**(1): 143-146.
- Keir, G., R. W. Luxton and E. J. Thompson (1990). "Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update." *Ann Clin Biochem* **27** ( Pt 5): 436-443.
- Kerbrat, A., S. Hamonic, E. Leray, I. Tron, G. Edan, J. Yaouanq and W. N. N. E. W (2015). "Ten-year prognosis in multiple sclerosis: a better outcome in relapsing-remitting patients but not in primary progressive patients." *European Journal of Neurology* **22**(3): 507-U545.
- Kevil, C. G., N. Okayama and J. S. Alexander (2001). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability II: importance of tyrosine phosphatase and kinase activity." *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(6): C1940-1947.
- Kikuchi, S., T. Fukazawa, M. Niino, I. Yabe, R. Miyagishi, T. Hamada, S. A. Hashimoto and K. Tashiro (2003). "HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. Human leukocyte antigen." *Neurology* **60**(4): 647-651.
- Kornek, B. and H. Lassmann (1999). "Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note." *Brain Pathology* **9**(4): 651-656.
- Kostulas, V. K., H. Link and A. K. Lefvert (1987). "Oligoclonal IgG bands in cerebrospinal-fluid - principles for demonstration and interpretation based on findings in 1114 neurological patients." *Archives of Neurology* **44**(10): 1041-1044.
- Krumbholz, M., T. Derfuss, R. Hohlfeld and E. Meinl (2012). "B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy." *Nat Rev Neurol* **8**(11): 613-623.
- Kuenz, B., A. Lutterotti, M. Khalil, R. Ehling, C. Gneiss, F. Deisenhammer, M. Reindl and T. Berger (2005). "Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* **167**(1-2): 143-149.
- Kuhle, J., C. Barro, G. Disanto, A. Mathias, C. Soneson, G. Bonnier, O. Yaldizli, A. Regeniter, T. Derfuss, M. Canales, M. Schluep, R. Du Pasquier, G. Krueger and C. Granziera (2016). "Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity." *Mult Scler* **22**(12): 1550-1559.
- Kuhle, J., G. Disanto, R. Dobson, R. Adiutori, L. Bianchi, J. Topping, J. P. Bestwick, U. C. Meier, M. Marta, G. Dalla Costa, T. Runia, E. Evdoshenko, N. Lazareva, E. Thouvenot, P. Iaffaldano, V. Direnzo, M. Khademi, F. Piehl, M. Comabella, M. Sombekke, J. Killestein, H. Hegen, S. Rauch, S. D'Alfonso, J. C. Alvarez-Cermeno, P. Kleinova, D. Horakova, R. Roesler, F. Lauda, S. Llufrui, T. Avsar, U. Uygunoglu, A. Altintas, S. Saip, T. Menge, C. Rajda, R. Bergamaschi, N. Moll, M. Khalil, R. Marignier, I. Dujmovic, H. Larsson, C. Malmestrom, E. Scarpini, C. Fenoglio, S. Wergeland, A. Laroni, V. Annibali, S. Romano, A. D. Martinez, A. Carra, M. Salvetti, A. Uccelli, O. Torkildsen, K. M. Myhr, D. Galimberti, K. Rejdak, J. Lycke, J. L. Frederiksen, J. Drulovic, C. Confavreux, D. Brassat, C. Enzinger, S. Fuchs, I. Bosca, J. Pelletier, C. Picard, E. Colombo, D. Franciotta, T. Derfuss, R. Lindberg, O. Yaldizli, L. Vecsei, B. C. Kieseier, H. P. Hartung, P. Villoslada, A. Siva, A. Saiz, H. Tumani, E. Havrdova, L. M. Villar, M. Leone, N. Barizzone, F. Deisenhammer, C. Teunissen, X. Montalban, M. Tintore, T. Olsson, M. Trojano, S. Lehmann, G. Castelnovo, S. Lapin, R. Hintzen, L. Kappos, R. Furlan, V. Martinelli, G. Comi, S. V. Ramagopalan and G. Giovannoni (2015). "Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study." *Mult Scler* **21**(8): 1013-1024.
- Kuhle, J., K. Plattner, J. P. Bestwick, R. L. Lindberg, S. V. Ramagopalan, N. Norgren, A. Nissim, A. Malaspina, D. Leppert, G. Giovannoni and L. Kappos (2013). "A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS." *Mult Scler* **19**(12): 1597-1603.

- Kupai, K., G. Szucs, S. Cseh, I. Hajdu, C. Csonka, T. Csont and P. Ferdinandy (2010). "Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography." Journal of Pharmacological and Toxicological Methods **61**(2): 205-209.
- Kurtzke, J. F. (1983). "Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)." Neurology **33**(11): 1444-1452.
- Kurtzke, J. F. (1995). "Ms Epidemiology World Wide - One View of Current Status." Acta Neurologica Scandinavica **91**: 23-33.
- Kurtzke, J. F. (2005). "Epidemiology and etiology of multiple sclerosis." Phys Med Rehabil Clin N Am **16**(2): 327-349.
- Kutzelnigg, A., J. C. Faber-Rod, J. Bauer, C. F. Lucchinetti, P. S. Sorensen, H. Laursen, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Schmidbauer and H. Lassmann (2007). "Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis." Brain Pathology **17**(1): 38-44.
- Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005a). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." Brain **128**: 2705-2712.
- Kutzelnigg, A. E., C. Lucchinetti, W. Brueck and M. Schmidbauer (2005b). "The pathology of progressive multiple sclerosis." Clinical Immunology **115**: S89-S89.
- La Russa, A., R. Cittadella, E. V. De Marco, P. Valentino, V. Andreoli, F. Trecroci, V. Latorre, A. Gambardella and A. Quattrone (2010). "Single nucleotide polymorphism in the MMP-9 gene is associated with susceptibility to develop multiple sclerosis in an Italian case-control study." J Neuroimmunol **225**(1-2): 175-179.
- Lampasona, V., D. Franciotta, R. Furlan, S. Zanaboni, R. Fazio, E. Bonifacio, G. Comi and G. Martino (2004). "Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects." Neurology **62**(11): 2092-2094.
- Lassmann, H. (2003). "Axonal injury in multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **74**(6): 695-697.
- Lassmann, H. (2007). "New concepts on progressive multiple sclerosis." Curr Neurol Neurosci Rep **7**(3): 239-244.
- Lassmann, H., W. Bruck and C. F. Lucchinetti (2007). "The immunopathology of multiple sclerosis: an overview." Brain Pathology **17**(2): 210-218.
- Leary, S. M. and A. J. Thompson (2003). "Interferon beta-1a in primary progressive multiple sclerosis." Journal of the Neurological Sciences **206**(2): 215-216.
- Lee, M. A., J. Palace, G. Stabler, J. Ford, A. Gearing and K. Miller (1999). "Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis - A longitudinal clinical and MRI study." Brain **122**: 191-197.
- Leinikki, P., I. Shekarchi, M. Iivanainen, E. Taskinen, K. V. Holmes, D. Madden and J. L. Sever (1982). "Virus-antibodies in the cerebrospinal-fluid of multiple-sclerosis patients detected with Elisa tests." Journal of the Neurological Sciences **57**(2-3): 249-255.
- Leone, M. A., S. Bonisconi, L. Collimedaglia, F. Tesser, S. Calzoni, A. Stecco, P. Naldi and F. Monaco (2008). "Factors predicting incomplete recovery from relapses in multiple sclerosis: a prospective study." Multiple Sclerosis Journal **14**(4): 485-493.
- Leppert, D., J. Ford, G. Stabler, C. Grygar, C. Lienert, S. Huber, K. M. Miller, S. L. Hauser and L. Kappos (1998). "Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis." Brain **121**: 2327-2334.
- Leray, E., J. Yaouanq, E. Le Page, M. Coustans, D. Laplaud, J. Oger and G. Edan (2010). "Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis." Brain **133**(Pt 7): 1900-1913.
- Levin, L. I., K. L. Munger, M. V. Rubertone, C. A. Peck, E. T. Lennette, D. Spiegelman and A. Ascherio (2005). "Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis." Jama - Journal of the American Medical Association **293**(20): 2496-2500.
- Li, J., S. Y. Lin, Y. B. Lv, H. M. Tang and F. Peng (2017). "Association Study of MMP-9-1562C/T Gene Polymorphism with Susceptibility to Multiple Autoimmune Diseases: A Meta-analysis." Archives of Medical Research **48**(1): 105-112.

- Lichtinghagen, R., T. Seifert, A. Kracke, S. Marckmann, U. Wurster and F. Heidenreich (1999). "Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis." Journal of Neuroimmunology **99**(1): 19-26.
- Lindberg, R. L. P., C. J. A. De Groot, L. Montagne, P. Freitag, P. van der Valk, L. Kappos and D. Leppert (2001). "The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis." Brain **124**: 1743-1753.
- Link, H. and Y. M. Huang (2006). "Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness." J Neuroimmunol **180**(1-2): 17-28.
- Liuzzi, G. M., M. Trojano, M. Fanelli, C. Avolio, A. Fasano, P. Livrea and P. Riccio (2002). "Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis." Mult Scler **8**(3): 222-228.
- Losy, J., A. Niezgodna and M. Wender (1999). "Increased serum levels of soluble PECAM-1 in multiple sclerosis patients with brain gadolinium-enhancing lesions." Journal of Neuroimmunology **99**(2): 169-172.
- Lublin, F. D. (2014). "New multiple sclerosis phenotypic classification." Eur Neurol **1**: 1-5.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-911.
- Lucchinetti, C., W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.
- Lucchinetti, C. F., Brück, W., Rodriguez, M. and Lassmann, H. (1996). "Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity in pathogenesis." Brain Pathology **6**: 259-274.
- Luessi, F., V. Siffrin and F. Zipp (2012). "Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies." Expert Rev Neurother **12**(9): 1061-1076.
- Lunding, J., R. Midgard and C. A. Vedeler (2000). "Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index." Acta Neurol Scand **102**(5): 322-325.
- Macchi, B., F. Marino-Merlo, U. Nocentini, V. Pisani, S. Cuzzocrea, S. Grelli and A. Mastino (2015). "Role of inflammation and apoptosis in multiple sclerosis: Comparative analysis between the periphery and the central nervous system." J Neuroimmunol **287**: 80-87.
- Maeda, A. and R. A. Sobel (1996). "Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 300-309.
- Magraner, M. J., I. Bosca, M. Simo-Castello, G. Garcia-Marti, A. Alberich-Bayarri, F. Coret, J. C. Alvarez-Cermeno, L. Marti-Bonmati, L. M. Villar and B. Casanova (2012). "Brain atrophy and lesion load are related to CSF lipid-specific IgM oligoclonal bands in clinically isolated syndromes." Neuroradiology **54**(1): 5-12.
- Mahad, D., H. Lassmann and D. Turnbull (2008). "Review: Mitochondria and disease progression in multiple sclerosis." Neuropathology and Applied Neurobiology **34**(6): 577-589.
- Mallard, C. (2012). "Innate Immune Regulation by Toll-Like Receptors in the Brain." ISRN Neurology **2012**: 701950.
- Mallucci, G., L. Peruzzotti-Jametti, J. D. Bernstock and S. Pluchino (2015). "The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis." Prog Neurobiol **127-128**: 1-22.
- Mandrioli, J., P. Sola, R. Bedin, M. Gambini and E. Merelli (2008). "A multifactorial prognostic index in multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid IgM oligoclonal bands and clinical features to predict the evolution of the disease." J Neurol **255**(7): 1023-1031.
- Maroco, J. B., R (2005). Estatística Aplicada às Ciências Sociais e Humanas, Manuais Universitários
- Marrie, R. A. (2004). "Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology." Lancet Neurol **3**(12): 709-718.

- Martinelli, V., M. Radaelli, L. Straffi, M. Rodegher and G. Comi (2009). "Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients." *Neurol Sci* **30**(2): 009-0142.
- Matrisian, L. M. (1992). "The Matrix-Degrading Metalloproteinases." *Bioessays* **14**(7): 455-463.
- McDonald, W. I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. J. Thompson, S. van den Noort, B. Y. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis." *Annals of Neurology* **50**(1): 121-127.
- McDonnell, G. V., S. A. McMillan, J. P. Douglas, A. G. Droogan and S. A. Hawkins (1998). "Raised CSF levels of soluble adhesion molecules across the clinical spectrum of multiple sclerosis." *Journal of Neuroimmunology* **85**(2): 186-192.
- McDonnell, G. V., S. A. McMillan, J. P. Douglas, A. G. Droogan and S. A. Hawkins (1999). "Serum soluble adhesion molecules in multiple sclerosis: raised sVCAM-1, sICAM-1 and sE-selectin in primary progressive disease." *Journal of Neurology* **246**(2): 87-92.
- McLean, B. N., R. W. Luxton and E. J. Thompson (1990). "A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications." *Brain* **113** (Pt 5): 1269-1289.
- McMillan, S. A., G. V. McDonnell, J. P. Douglas and S. A. Hawkins (2000). "Evaluation of the clinical utility of cerebrospinal fluid (CSF) indices of inflammatory markers in multiple sclerosis." *Acta Neurologica Scandinavica* **101**(4): 239-243.
- Mead, R. J., S. K. Singhrao, J. W. Neal, H. Lassmann and B. P. Morgan (2002). "The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury." *Journal of Immunology* **168**(1): 458-465.
- Meinl, E., M. Krumbholz and R. Hohlfeld (2006). "B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation." *Ann Neurol* **59**(6): 880-892.
- Michel, L., H. Touil, N. B. Pikor, J. L. Gommerman, A. Prat and A. Bar-Or (2015). "B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation." *Frontiers in Immunology* **6**: 636.
- Middleton, L. T. and G. Dean (1991). "Multiple-Sclerosis in Cyprus." *Journal of the Neurological Sciences* **103**(1): 29-36.
- Millefiorini, E., C. Gasperini, C. Pozzilli, F. D'Andrea, S. Bastianello, M. Trojano, S. Morino, V. B. Morra, A. Bozzao, A. Calo, M. L. Bernini, D. Gambi and M. Prencipe (1997). "Randomized placebo-controlled trial of mitoxantrone in relapsing-remitting multiple sclerosis: 24-month clinical and MRI outcome." *J Neurol* **244**(3): 153-159.
- Miller, D. H., F. Barkhof and J. J. P. Nauta (1993). "Gadolinium Enhancement Increases the Sensitivity of Mri in Detecting Disease-Activity in Multiple-Sclerosis." *Brain* **116**: 1077-1094.
- Milo, R. and E. Kahana (2010). "Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment." *Autoimmun Rev* **9**(5): A387-394.
- Milonas, I., S. Tsounis and I. Logothetis (1990). "Epidemiology of Multiple-Sclerosis in Northern Greece." *Acta Neurologica Scandinavica* **81**(1): 43-47.
- Minagar, A., W. Jy, J. J. Jimenez, W. A. Sheremata, L. M. Mauro, W. W. Mao, L. L. Horstman and Y. S. Ahn (2001). "Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis." *Neurology* **56**(10): 1319-1324.
- Miranda-Hernandez, S. and A. G. Baxter (2013). "Role of toll-like receptors in multiple sclerosis." *American journal of clinical and experimental immunology* **2**(1): 75-93.
- Miron, V. E., A. Boyd, J. W. Zhao, T. J. Yuen, J. M. Ruckh, J. L. Shadrach, P. van Wijngaarden, A. J. Wagers, A. Williams, R. J. M. Franklin and C. Ffrench-Constant (2013). "M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination." *Nat Neurosci* **16**(9): 1211-1218.

- Mirowska-Guzel, D., G. Gromadzka, A. Czlonkowski and A. Czlonkowska (2009). "Association of MMP1, MMP3, MMP9, and MMP12 polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population." *J Neuroimmunol* **214**(1-2): 113-117.
- Mirshafiey, A., B. Asghari, G. Ghalamfarsa, F. Jadidi-Niaragh and G. Azizi (2014). "The significance of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis." *Sultan Qaboos Univ Med J* **14**(1): e13-25.
- Moroso, A., M. S. Deloire, A. Ruet, J. C. Ouallet, R. Casey and B. Brochet (2015). "Does cerebrospinal fluid analysis add predictive value to magnetic resonance imaging for long term irreversible disability in patients with early multiple sclerosis?" *J Neurol Sci* **354**(1-2): 51-55.
- Mossner, R., K. Fassbender, J. Kuhnen, A. Schwartz and M. Hennerici (1996). "Circulating L-selectin in multiple sclerosis patients with active, gadolinium-enhancing brain plaques." *Journal of Neuroimmunology* **65**(1): 61-65.
- Muls, N., K. Jnaoui, H. A. Dang, A. Wauters, J. Van Snick, C. J. Sindic and V. van Pesch (2012). "Upregulation of IL-17, but not of IL-9, in circulating cells of CIS and relapsing MS patients. Impact of corticosteroid therapy on the cytokine network." *J Neuroimmunol* **243**(1-2): 73-80.
- Mumford, C. J., N. W. Wood, H. Kellarwood, J. W. Thorpe, D. H. Miller and D. A. S. Compston (1994). "The British-Isles Survey of Multiple-Sclerosis in Twins." *Neurology* **44**(1): 11-15.
- Munger, K. L., S. M. Zhang, E. O'Reilly, M. A. Hernan, M. J. Olek, W. C. Willett and A. Ascherio (2004). "Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis." *Neurology* **62**(1): 60-65.
- Murray, T. J. (2009). "The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries." *J Neurol Sci* **1**(277): 70003-70006.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "Matrix metalloproteinases." *J Biol Chem* **274**(31): 21491-21494.
- Nair, A., T. J. Frederick and S. D. Miller (2008). "Astrocytes in multiple sclerosis: A product of their environment." *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**(17): 2702.
- Napoli, I. and H. Neumann (2010). "Protective effects of microglia in multiple sclerosis." *Exp Neurol* **225**(1): 24-28.
- Nelissen, I., B. Dubois, A. Goris, I. Ronsse, H. Carton and G. Opdenakker (2002). "Gelatinase B, PECAM-1 and MCP-3 gene polymorphisms in Belgian multiple sclerosis." *J Neurol Sci* **200**(1-2): 43-48.
- Nelissen, I., K. Vandebroek, P. Fiten, J. Hillert, T. Olsson, M. G. Marrosu and G. Opdenakker (2000). "Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not a susceptibility factor for multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **105**(1): 58-63.
- Nicoletti, A., M. L. Lo Bartolo, S. Lo Fermo, V. Cocuzza, M. R. Panetta, C. Marletta, M. R. Ciancio, M. L. Cataldi, F. Patti and A. Reggio (2001). "Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Catania, Sicily." *Neurology* **56**(1): 62-66.
- Nischwitz, S., C. Wolf, T. F. Andlauer, D. Czamara, U. K. Zettl, P. Rieckmann, D. Buck, M. Ising, T. Bettecken, B. Mueller-Myhsok and F. Weber (2015). "MS susceptibility is not affected by single nucleotide polymorphisms in the MMP9 gene." *J Neuroimmunol* **279**: 46-49.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). "Medical progress: Multiple sclerosis." *New England Journal of Medicine* **343**(13): 938-952.
- Nuyts, A. H., W. P. Lee, R. Bashir-Dar, Z. N. Berneman and N. Cools (2013). "Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies?" *Mult Scler* **19**(8): 995-1002.
- Nylander, A. and D. A. Hafler (2012). "Multiple sclerosis." *Journal of Clinical Investigation* **122**(4): 1180-1188.
- O'Connor, P., J. S. Wolinsky, C. Confavreux, G. Comi, L. Kappos, T. P. Olsson, H. Benzerdjeb, P. Truffinet, L. Wang, A. Miller and M. S. Freedman (2011). "Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **365**(14): 1293-1303.
- Obermeier, B., L. Lovato, R. Mentele, W. Brück, I. Forne, A. Imhof, F. Lottspeich, K. W. Turk, S. N. Willis, H. Wekerle, R. Hohlfeld, D. A. Hafler, K. C. O'Connor and K. Dornmair

- (2011). "Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin." Journal of Neuroimmunology **233**(1-2): 245-248.
- Ogata, Y., J. J. Enghild and H. Nagase (1992). "Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9." J Biol Chem **267**(6): 3581-3584.
- Okamoto, T., T. Akaike, M. Suga, S. Tanase, H. Horie, S. Miyajima, M. Ando, Y. Ichinose and H. Maeda (1997). "Activation of human matrix metalloproteinases by various bacterial proteinases." J Biol Chem **272**(9): 6059-6066.
- Oller-Salvia, B., M. Sanchez-Navarro, E. Giralt and M. Teixido (2016). "Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery." Chem Soc Rev **45**(17): 4690-4707.
- Orrell, R. W. (2005). "Multiple Sclerosis: The History of a Disease." Journal of the Royal Society of Medicine **98**(6): 289-289.
- Ortiz, G. G., M. A. Macias-Islas, F. P. Pacheco-Moises, J. A. Cruz-Ramos, S. Sustersik, E. A. Barba and A. Aguayo (2009). "Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." Disease Markers **26**(1): 35-39.
- Ortiz, G. G., F. P. Pacheco-Moises, M. A. Macias-Islas, L. J. Flores-Alvarado, M. A. Mireles-Ramirez, E. D. Gonzalez-Renovato, V. E. Hernandez-Navarro, A. L. Sanchez-Lopez and M. A. Alatorre-Jimenez (2014). "Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis." Archives of Medical Research **45**(8): 687-697.
- Orton, S. M., B. M. Herrera, I. M. Yee, W. Valdar, S. V. Ramagopalan, A. D. Sadovnick and G. C. Ebers (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." Lancet Neurol **5**(11): 932-936.
- Owens, G. P., J. L. Bennett, D. H. Gilden and M. P. Burgoon (2006). "The B cell response in multiple sclerosis." Neurol Res **28**(3): 236-244.
- Pace, A. A. and J. P. Zajicek (2009). "Melanoma following treatment with alemtuzumab for multiple sclerosis." European Journal of Neurology **16**(4): E70-E71.
- Pashenkov, M., Y. M. Huang, V. Kostulas, M. Haglund, M. Soderstrom and H. Link (2001). "Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid." Brain **124**(Pt 3): 480-492.
- Peferoen, L. A., D. Y. Vogel, K. Ummenthum, M. Breur, P. D. Heijnen, W. H. Gerritsen, R. M. Peferoen-Baert, P. van der Valk, C. D. Dijkstra and S. Amor (2015). "Activation status of human microglia is dependent on lesion formation stage and remyelination in multiple sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **74**(1): 48-63.
- Pellerin, L., J. A. Jenks, P. Bégin, R. Bacchetta and K. C. Nadeau (2014). "Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy." Immunologic research **58**(0): 358-368.
- Perini, P., F. Ranzato, M. Calabrese, L. Battistin and P. Gallo (2006). "Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **77**(8): 953-955.
- Petzold, A., M. D. Steenwijk, J. M. Eikelenboom, M. P. Wattjes and B. M. Uitdehaag (2016). "Elevated CSF neurofilament proteins predict brain atrophy: A 15-year follow-up study." Mult Scler **22**(9): 1154-1162.
- Pina, M. A., J. R. Ara, P. J. Modrego, F. Morales and J. L. Capablo (1998). "Prevalence of multiple sclerosis in the Sanitary District of Calatayud, northern Spain: Is Spain a zone of high risk for this disease?" Neuroepidemiology **17**(5): 258-264.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara, A. W. Sandrock and A. Investigators (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." New England Journal of Medicine **354**(9): 899-910.
- Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." Ann Neurol **69**(2): 292-302.

- Polman, C. H., S. C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H. P. Hartung, L. Kappos, F. D. Lublin, L. M. Metz, H. F. McFarland, P. W. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, B. G. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2005). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 Revisions to the "McDonald Criteria"." *Annals of Neurology* **58**(6): 840-846.
- Ponsonby, A. L., I. van der Mei, T. Dwyer, L. Blizzard, B. Taylor, A. Kemp, R. Simmons and T. Kilpatrick (2005). "Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis." *JAMA* **293**(4): 463-469.
- Poser, C. M., D. W. Paty, L. Scheinberg, W. I. McDonald, F. A. Davis, G. C. Ebers, K. P. Johnson, W. A. Sibley, D. H. Silberberg and W. W. Tourtellotte (1983). "New Diagnostic-Criteria for Multiple-Sclerosis - Guidelines for Research Protocols." *Annals of Neurology* **13**(3): 227-231.
- PRISMS and U. B. C. M. A. G (2001). "PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS (vol 55, pg 1628, 2001)." *Neurology* **57**(6): 1146-1146.
- Puccioni-Sohler, M., F. Passeri, C. Oliveira, C. O. Brandao and R. Papaiz-Alvarenga (1999). "Multiple sclerosis in Brazil. Analysis of cerebrospinal fluid by standard methods." *Arq Neuropsiquiatr* **57**(4): 927-931.
- Pugliatti, M., S. Sotgiu, G. Solinas, P. Castiglia, M. I. Pirastru, B. Murgia, L. Mannu, G. Sanna and G. Rosati (2001). "Multiple sclerosis epidemiology in Sardinia: evidence for a true increasing risk." *Acta Neurologica Scandinavica* **103**(1): 20-26.
- Ragonese, P., G. Salemi, M. D'Amelio, M. Gammino, P. Aridon and G. Savettieri (2004). "Multiple sclerosis in southern Europe: Monreale city, Italy - A twenty-year follow-up incidence and prevalence study." *Neuroepidemiology* **23**(6): 306-309.
- Rammohan, K. W. (2009). "Cerebrospinal fluid in multiple sclerosis." *Annals of Indian Academy of Neurology* **12**(4): 246-253.
- Ransohoff, R. M. and B. Engelhardt (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **12**(9): 623-635.
- Reiber, H., E. J. Thompson, G. Grimsley, G. Bernardi, P. Adam, S. Monteiro de Almeida, P. Fredman, G. Keir, M. Lammers, R. Liblau, M. Menna-Barreto, M. J. Sa, E. Seres, C. J. Sindic, A. Teelken, C. Trendelenburg, M. Trojano, M. P. van Antwerpen and M. M. Verbeek (2003). "Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion." *Clin Chem Lab Med* **41**(3): 331-337.
- Reindl, M., C. Linington, U. Brehm, R. Egg, E. Dilitz, F. Deisenhammer, W. Poewe and T. Berger (1999). "Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study." *Brain* **122** ( Pt 11): 2047-2056.
- Rieckmann, P., B. Altmann, A. Riegel, J. Baudewig and K. Felgenhauer (1997). "Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis." *Annals of Neurology* **41**(3): 326-333.
- Rieckmann, P., S. Martin, I. Weichselbraun, M. Albrecht, B. Kitze, T. Weber, H. Tumani, A. Broocks, W. Luer, A. Helwig and S. Poser (1994). "Serial analysis of circulating adhesion molecules and Tnf Receptor in serum from patients with multiple-sclerosis - Cicam-1 Is an indicator for relapse." *Neurology* **44**(12): 2367-2372.
- Risau, W. and H. Wolburg (1990). "Development of the Blood-Brain-Barrier." *Trends in Neurosciences* **13**(5): 174-178.
- Rosati, G. (2001). "The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update." *Neurological Sciences* **22**(2): 117-139.
- Rosati, G., I. Aiello, M. I. Pirastru, L. Mannu, G. Sanna, G. F. Sau and S. Sotgiu (1996). "Epidemiology of multiple sclerosis in northwestern Sardinia: Further evidence for higher frequency in Sardinians compared to other Italians." *Neuroepidemiology* **15**(1): 10-19.
- Rubertone, M. V. and J. F. Brundage (2002). "The Defense Medical Surveillance System and the Department of Defense serum repository: Glimpses of the future of public health surveillance." *Am J Public Health* **92**(12): 1900-1904.
- Rudick, R., J. Antel, C. Confavreux, G. Cutter, G. Ellison, J. Fischer, F. Lublin, A. Miller, J. Petkau, S. Rao, S. Reingold, K. Syndulko, A. Thompson, J. Wallenberg, B. Weinshenker

- and E. Willoughby (1996). "Clinical outcomes assessment in multiple sclerosis." Annals of Neurology **40**(3): 469-479.
- Russell, W. R. (1971). "Multiple Sclerosis - Occupation and Social Group at Onset." Lancet **2**(7729): 832-&.
- Sa, M. J., L. Sequeira, M. E. Rio and E. J. Thompson (2005). "Oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid of portuguese patients with multiple sclerosis: negative results indicate benign disease." Arq Neuropsiquiatr **63**(2B): 375-379.
- Sadaba, M. C., J. Tzartos, C. Paino, M. Garcia-Villanueva, J. C. Alvarez-Cermenó, M. V. C. Luisa and M. M. Esiri (2012). "Axonal and oligodendrocyte-localized IgM and IgG deposits in MS lesions." Journal of Neuroimmunology **247**(1-2): 86-94.
- Sadovnick, A. D. and G. C. Ebers (1995). "Genetics of Multiple-Sclerosis." Neurologic Clinics **13**(1): 99-118.
- Salama, N. N., N. D. Eddington and A. Fasano (2006). "Tight junction modulation and its relationship to drug delivery." Adv Drug Deliv Rev **58**(1): 15-28.
- Salemi, G., P. Ragonese, P. Aridon, G. Scola, V. Saporito, S. Conte and G. Savettieri (2000). "Incidence of multiple sclerosis in Bagheria City, Sicily, Italy." Neurological Sciences **21**(6): 361-365.
- Salzer, J., A. Svenningsson and P. Sundstrom (2010). "Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis." Multiple Sclerosis **16**(3): 287-292.
- Sato, W., A. Tomita, D. Ichikawa, Y. W. Lin, H. Kishida, S. Miyake, M. Ogawa, T. Okamoto, M. Murata, Y. Kuroiwa, T. Aranami and T. Yamamura (2012). "CCR2(+)/CCR5(+) T Cells Produce Matrix Metalloproteinase-9 and Osteopontin in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis." Journal of Immunology **189**(10): 5057-5065.
- Sawcer, S. (2008). "The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects." Brain **131**: 3118-3131.
- Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Eddins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermodé, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppä, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah,

- M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivinson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.
- Sawcer, S., G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. A. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. M. Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. C. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. W. de Bakker, M. Debouverie, M. B. D'hooghe, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. A. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermode, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. A. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. A. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. T. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivinson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly, A. Compston, I. M. S. G. Co and W. T. C. C. Consor (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." *Nature* **476**(7359): 214-219.
- Schneider, R., B. Euler and S. Rauer (2007). "Intrathecal IgM-synthesis does not correlate with the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event." *European Journal of Neurology* **14**(8): 907-911.
- Schreibelt, G., R. J. Musters, A. Reijerkerk, L. R. de Groot, S. M. van der Pol, E. M. Hendriks, E. D. Dopp, C. D. Dijkstra, B. Drukarch and H. E. de Vries (2006). "Lipoic acid affects

- cellular migration into the central nervous system and stabilizes blood-brain barrier integrity." J Immunol **177**(4): 2630-2637.
- Schumacher, G. A., G. Beebe, R. F. Kibler, L. T. Kurland, J. F. Kurtzke, F. McDowell, B. Nagler, W. A. Sibley, W. W. Tourtellotte and T. L. Willmon (1965). "Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis." Ann N Y Acad Sci **122**: 552-568.
- Schwenkenbecher, P., R. Pul, U. Wurster, J. Conzen, K. Pars, H. Hartmann, K. W. Suhs, L. Sedlacek, M. Stangel, C. Trebst and T. Skripuletz (2017). "Common and uncommon neurological manifestations of neuroborreliosis leading to hospitalization." Bmc Infectious Diseases **17**.
- Schwenkenbecher, P., A. Sarikidi, U. Wurster, P. Bronzlik, K.-W. Sühs, P. Raab, M. Stangel, R. Pul and T. Skripuletz (2016). "McDonald Criteria 2010 and 2005 Compared: Persistence of High Oligoclonal Band Prevalence Despite Almost Doubled Diagnostic Sensitivity." Int J Mol Sci **17**(9): 1592.
- Scott, G. S., P. Hake, R. B. Kean, L. Virag, C. Szabo and D. C. Hooper (2001). "Role of poly(ADP-ribose) synthetase activation in the development of experimental allergic encephalomyelitis." Journal of Neuroimmunology **117**(1-2): 78-86.
- Sedel, F., D. Bernard, D. M. Mock and A. Tourbah (2016). "Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis." Neuropharmacology **110**(Pt B): 644-653.
- Sellebjerg, F., H. O. Madsen, C. V. Jensen, J. Jensen and P. Garred (2000). "CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **102**(1): 98-106.
- Selmaj, K., C. S. Raine and A. H. Cross (1991). "Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination." Ann Neurol **30**(5): 694-700.
- Serafini, B., B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, E. Capello, G. L. Mancardi and F. Aloisi (2006). "Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells." J Neuropathol Exp Neurol **65**(2): 124-141.
- Sewell, D. L., E. K. Reinke, L. H. Hogan, M. Sandor and Z. Fabry (2002). "Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections." Immunology Letters **82**(1-2): 101-110.
- Sharief, M. K., M. A. Noori, M. Ciardi, A. Cirelli and E. J. Thompson (1993). "Increased Levels of Circulating Icam-1 in Serum and Cerebrospinal-Fluid of Patients with Active Multiple-Sclerosis - Correlation with Tnf-Alpha and Blood-Brain-Barrier Damage." Journal of Neuroimmunology **43**(1-2): 15-21.
- Shirodaria, P. V., M. Haire, E. Fleming, J. D. Merrett, S. A. Hawkins and S. D. Roberts (1987). "Viral Antibody-Titers - Comparison in Patients with Multiple-Sclerosis and Rheumatoid-Arthritis." Archives of Neurology **44**(12): 1237-1241.
- Shiryaev, S. A., A. Y. Savinov, P. Cieplak, B. I. Ratnikov, K. Motamedchaboki, J. W. Smith and A. Y. Strongin (2009). "Matrix Metalloproteinase Proteolysis of the Myelin Basic Protein Isoforms Is a Source of Immunogenic Peptides in Autoimmune Multiple Sclerosis." Plos One **4**(3).
- Siritho, S. and M. S. Freedman (2009). "The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis." J Neurol Sci **279**(1-2): 21-25.
- Skov, A. G., T. Skov and J. L. Frederiksen (2010). "Oligoclonal bands predict multiple sclerosis after optic neuritis: a literature survey." Multiple Sclerosis Journal **17**(4): 404-410.
- Smith, K. J. (2007). "Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy." Brain Pathology **17**(2): 230-242.
- Smolders, J., J. Damoiseaux, P. Menheere, J. W. C. Tervaert and R. Hupperts (2009a). "Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis." Journal of Neuroimmunology **207**(1-2): 117-121.
- Smolders, J., E. Peelen, M. Thewissen, P. Menheere, J. W. C. Tervaert, R. Hupperts and J. Damoiseaux (2009b). "The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis." Autoimmun Rev **8**(7): 621-626.

- Sola, P., J. Mandrioli, A. M. Simone, D. Ferraro, R. Bedin, R. Annecca, M. G. Venneri, P. F. Nichelli and E. Merelli (2011). "Primary progressive versus relapsing-onset multiple sclerosis: presence and prognostic value of cerebrospinal fluid oligoclonal IgM." Mult Scler **17**(3): 303-311.
- Solaro, C., C. Allemani, M. M. Uccelli, E. Canevari, N. Dagnino, R. Pizio, G. Regesta, P. Tanganelli, M. A. Battaglia and G. L. Mancardi (2005). "The prevalence of multiple sclerosis in the north-west Italian province of Genoa." Journal of Neurology **252**(4): 436-440.
- Sorensen, P. S., F. Deisenhammer, P. Duda, R. Hohlfeld, K. M. Myhr, J. Palace, C. Polman, C. Pozzilli and C. Ross (2005). "Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis." Eur J Neurol **12**(11): 817-827.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annual Review of Immunology **23**: 683-747.
- Spuch, C. a. N., C. (2010). "Transport mechanisms at the Blood-Cerebrospinal-Fluid Barrier: role of Megalin (LRP2)." Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery **4**: 1-16.
- St Jean, P. L., X. C. Zhang, B. K. Hart, H. Lamlum, M. W. Webster, D. L. Steed, A. M. Henney and R. E. Ferrell (1995). "Characterization of a dinucleotide repeat in the 92 kDa type IV collagenase gene (CLG4B), localization of CLG4B to chromosome 20 and the role of CLG4B in aortic aneurysmal disease." Ann Hum Genet **59**(Pt 1): 17-24.
- Stadelmann, C., M. Kerschensteiner, T. Misgeld, W. Bruck, R. Hohlfeld and H. Lassmann (2002). "BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells?" Brain **125**(Pt 1): 75-85.
- Stefani, I. C., D. Wright, K. M. Polizzi and C. Kontoravdi (2012). "The Role of ER Stress-Induced Apoptosis in Neurodegeneration." Current Alzheimer Research **9**(3): 373-387.
- Steinman, L. (1996). "Multiple sclerosis: A coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system." Cell **85**(3): 299-302.
- Steinman, L. (2001). "Multiple sclerosis: a two-stage disease." Nat Immunol **2**(9): 762-764.
- Sundstrom, P., P. Juto, G. Wadell, G. Hallmans, A. Svenningsson, L. Nystrom, J. Dillner and L. Forsgren (2004). "An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study." Neurology **62**(12): 2277-2282.
- Tanasescu, R., N. Evangelou and C. S. Constantinescu (2013). "Role of oral teriflunomide in the management of multiple sclerosis." Neuropsychiatric Disease and Treatment **9**: 539-553.
- Teunissen, C. E., E. Iacobaeus, M. Khademi, L. Brundin, N. Norgren, M. J. A. Koel-Simmelink, M. Schepens, F. Bouwman, H. A. M. Twaalfhoven, H. J. Blom, C. Jakobs and C. D. Dijkstra (2009). "Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis." Neurology **72**(15): 1322-1329.
- Teunissen, C. E. and M. Khalil (2012). "Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis." Mult Scler **18**(5): 552-556.
- Thacker, E. L., F. Mirzaei and A. Ascherio (2006). "Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis." Annals of Neurology **59**(3): 499-503.
- Thangarajh, M., J. Gomez-Rial, A. K. Hedstrom, J. Hillert, J. C. Alvarez-Cermenon, T. Masterman and L. M. Villar (2008). "Lipid-specific immunoglobulin M in CSF predicts adverse long-term outcome in multiple sclerosis." Mult Scler **14**(9): 1208-1213.
- Thompson, E. J. (1995). "Cerebrospinal fluid." Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry **59**(4): 349-357.
- Tintore, M., A. Rovira, J. Rio, S. Otero-Romero, G. Arrambide, C. Tur, M. Comabella, C. Nos, M. J. Arevalo, L. Negrotto, I. Galan, A. Vidal-Jordana, J. Castillo, F. Palavra, E. Simon, R. Mitjana, C. Auger, J. Sastre-Garriga and X. Montalban (2015). "Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis." Brain **138**: 1863-1874.
- Tola, M. A., M. I. Yugueros, N. Fernandez-Buey and R. Fernandez-Herranz (1999). "Prevalence of multiple sclerosis in Valladolid, northern Spain." Journal of Neurology **246**(3): 170-174.

- Torkildsen, O., K. M. Myhr and L. Bo (2016). "Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications." Eur J Neurol **1**: 18-27.
- Toth, M., M. M. Bernardo, D. C. Gervasi, P. D. Soloway, Z. Wang, H. F. Bigg, C. M. Overall, Y. A. DeClerck, H. Tschesche, M. L. Cher, S. Brown, S. Mobashery and R. Fridman (2000). "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 acts synergistically with synthetic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors but not with TIMP-4 to enhance the (Membrane type 1)-MMP-dependent activation of pro-MMP-2." J Biol Chem **275**(52): 41415-41423.
- Trapp, B. D. and P. K. Stys (2009). "Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis." Lancet Neurol **8**(3): 280-291.
- Trentini, A., M. Castellazzi, C. Cervellati, M. C. Manfrinato, C. Tamborino, S. Hanau, C. A. Volta, E. Baldi, V. Kostic, J. Drulovic, E. Granieri, F. Dallochio, T. Bellini, I. Dujmovic and E. Fainardi (2016). "Interplay between Matrix Metalloproteinase-9, Matrix Metalloproteinase-2, and Interleukins in Multiple Sclerosis Patients." Disease Markers **3672353**(10): 31.
- Trentini, A., M. Comabella, M. Tintore, M. J. Koel-Simmelink, J. Killestein, B. Roos, A. Rovira, C. Korth, P. Ottis, M. A. Blankenstein, X. Montalban, T. Bellini and C. E. Teunissen (2014). "N-acetylaspartate and neurofilaments as biomarkers of axonal damage in patients with progressive forms of multiple sclerosis." J Neurol **261**(12): 2338-2343.
- Trentini, A., M. C. Manfrinato, M. Castellazzi, C. Tamborino, G. Roversi, C. A. Volta, E. Baldi, M. R. Tola, E. Granieri, F. Dallochio, T. Bellini and E. Fainardi (2015). "TIMP-1 resistant matrix metalloproteinase-9 is the predominant serum active isoform associated with MRI activity in patients with multiple sclerosis." Mult Scler **21**(9): 1121-1130.
- Trojano, M., C. Avolio, G. M. Liuzzi, M. Ruggieri, G. Defazio, M. Liguori, M. P. Santacroce, D. Paolicelli, F. Giuliani, P. Riccio and P. Livrea (1999). "Changes of serum sICAM-1 and MMP-9 induced by rIFN beta-1b treatment in relapsing-remitting MS." Neurology **53**(7): 1402-1408.
- Trojano, M., C. Avolio, I. L. Simone, G. Defazio, C. Manzari, F. De Robertis, A. Calo and P. Livrea (1996). "Soluble intercellular adhesion molecule-1 in serum and cerebrospinal fluid of clinically active relapsing-remitting multiple sclerosis: Correlation with Gd-DTPA magnetic resonance imaging-enhancement and cerebrospinal fluid findings." Neurology **47**(6): 1535-1541.
- Ukkonen, M., K. Wu, B. Reipert, P. Dastidar and I. Elovaara (2007). "Cell surface adhesion molecules and cytokine profiles in primary progressive multiple sclerosis." Mult Scler **13**(6): 701-707.
- Upadhyay, R. K. (2014). "Drug Delivery Systems, CNS Protection, and the Blood Brain Barrier." Biomed Research International.
- Uzawa, A., M. Mori, S. Masuda and S. Kuwabara (2011). "Markedly elevated soluble intercellular adhesion molecule 1, soluble vascular cell adhesion molecule 1 levels, and blood-brain barrier breakdown in neuromyelitis optica." Arch Neurol **68**(7): 913-917.
- Valado, A., M. J. Leitao, A. Martinho, R. Pascoal, J. Cerqueira, I. Correia, S. Batista, L. Sousa and I. Baldeiras (2017). "Multiple sclerosis: Association of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 with risk and clinical course the disease." Multiple Sclerosis and Related Disorders **11**: 71-76.
- Valado, A., T. Proenca, J. Sargento-Freitas, S. Batista, L. Sousa, C. R. Oliveira and I. Baldeiras (2012). "Biomarkers of blood-brain barrier in the progression of multiple sclerosis." Multiple Sclerosis Journal **18**: 262-263.
- Van Den Steen, P. E., P. Proost, B. Grillet, D. D. Brand, A. H. Kang, J. Van Damme and G. Opdenakker (2002). "Cleavage of denatured natural collagen type II by neutrophil gelatinase B reveals enzyme specificity, post-translational modifications in the substrate, and the formation of remnant epitopes in rheumatoid arthritis." Faseb Journal **16**(3).
- Van der Goes, A., D. Wouters, S. M. Van Der Pol, R. Huizinga, E. Ronken, P. Adamson, J. Greenwood, C. D. Dijkstra and H. E. De Vries (2001). "Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro." FASEB J **15**(10): 1852-1854.

- Van der Mei, I. A. F., A. L. Ponsonby, T. Dwyer, L. Blizzard, R. Simmons, B. V. Taylor, H. Butzkueven and T. Kilpatrick (2003). "Past exposure to sun, skin phenotype, and risk of multiple sclerosis: case-control study." *British Medical Journal* **327**(7410): 316-320.
- Van Wart, H. E. and H. Birkedal-Hansen (1990). "The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(14): 5578-5582.
- Villar, L., N. Garcia-Barragan, M. Espino, E. Roldan, M. Sadaba, J. Gomez-Rial, P. Gonzalez-Porque and J. Alvarez-Cermeno (2008). "Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course." *Mult Scler* **14**(2): 183-187.
- Villar, L. M., B. Casanova, N. Ouamara, M. Comabella, F. Jalili, D. Leppert, C. de Andres, G. Izquierdo, R. Arroyo, T. Avsar, S. V. Lapin, T. Johnson, X. Montalban, O. Fernandez, R. Alvarez-Lafuente, D. Masterman, M. I. Garcia-Sanchez, F. Coret, A. Siva, E. Evdoshenko, J. C. Alvarez-Cermeno and A. Bar-Or (2014). "Immunoglobulin M oligoclonal bands: Biomarker of targetable inflammation in primary progressive Multiple Sclerosis." *Annals of Neurology* **76**(2): 231-240.
- Villar, L. M., P. Gonzalez-Porque, J. Masjuan, J. C. Alvarez-Cermeno, A. Bootello and G. Keir (2001). "A sensitive and reproducible method for the detection of oligoclonal IgM bands." *J Immunol Methods* **258**(1-2): 151-155.
- Villar, L. M., J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, J. Plaza, M. C. Sadaba, E. Roldan, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2002a). "Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS." *Neurology* **58**(5): 824-826.
- Villar, L. M., J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, J. Plaza, M. C. Sadaba, E. Roldan, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2002b). "Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS." *Neurology* **59**(4): 555-559.
- Villar, L. M., J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, J. Plaza, M. C. Sadaba, E. Roldan, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2003). "Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis." *Annals of Neurology* **53**(2): 222-226.
- Villar, L. M., T. Masterman, B. Casanova, J. Gomez-Rial, M. Espino, M. C. Sadaba, P. Gonzalez-Porque, F. Coret and J. C. Alvarez-Cermeno (2009). "CSF oligoclonal band patterns reveal disease heterogeneity in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **211**(1-2): 101-104.
- Villar, L. M., C. Picon, L. Costa-Frossard, R. Alenda, J. Garcia-Caldentey, M. Espino, A. Muriel and J. C. Alvarez-Cermeno (2015). "Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis." *European Journal of Neurology* **22**(8): 1169-1175.
- Villar, L. M., M. C. Sadaba, E. Roldan, J. Masjuan, P. Gonzalez-Porque, N. Villarrubia, M. Espino, J. A. Garcia-Trujillo, A. Bootello and J. C. Alvarez-Cermeno (2005a). "Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS." *J Clin Invest* **115**(1): 187-194.
- Wandinger, K. P., W. Jabs, A. Siekhaus, S. Bubel, P. Trillenber, H. J. Wagner, K. Wessel, H. Kirchner and H. Hennig (2000). "Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS." *Neurology* **55**(2): 178-184.
- Warner, H. B. and R. I. Carp (1981). "Multiple-Sclerosis and Epstein-Barr Virus." *Lancet* **2**(8258): 1290-1290.
- Waubant, E. (2006). "Biomarkers indicative of blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis." *Disease Markers* **22**(4): 235-244.
- Waubant, E., L. Gee, K. Miller, G. Stabler and D. Goodkin (2001). "IFN-beta1a may increase serum levels of TIMP-1 in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis." *J Interferon Cytokine Res* **21**(3): 181-185.
- Waubant, E., D. Goodkin, A. Bostrom, P. Bacchetti, J. Hietpas, R. Lindberg and D. Leppert (2003). "IFN beta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS." *Neurology* **60**(1): 52-57.
- Waubant, E., D. E. Goodkin, L. Gee, P. Bacchetti, R. Sloan, T. Stewart, P. B. Andersson, G. Stabler and K. Miller (1999a). "Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis." *Neurology* **53**(7): 1397-1401.

- Waxman, S. G. (2006). "Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels." Nature Reviews Neuroscience **7**(12): 932-941.
- Waxman, S. G. and J. M. Ritchie (1993). "Molecular dissection of the myelinated axon." Ann Neurol **33**(2): 121-136.
- Wilhelm, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1989). "Sv40-Transformed Human-Lung Fibroblasts Secrete a 92-Kda Type-Iv Collagenase Which Is Identical to That Secreted by Normal Human Macrophages." Journal of Biological Chemistry **264**(29): 17213-17221.
- Willer, C. J., D. A. Dyment, A. D. Sadovnick, P. M. Rothwell, T. J. Murray, G. C. Ebers and C. C. S. Grp (2005). "Timing of birth and risk of multiple sclerosis: population based study." British Medical Journal **330**(7483): 120-123.
- Willison, H. J. and C. Linington (2012). "Antibodies to MOG in NMO: a seasoned veteran finds a new role." Neurology **79**(12): 1198-1199.
- Wilson, E. H., W. Weninger and C. A. Hunter (2010). "Trafficking of immune cells in the central nervous system." Journal of Clinical Investigation **120**(5): 1368-1379.
- Witte, M. E., L. Bo, R. J. Rodenburg, J. A. Belien, R. Musters, T. Hazes, L. T. Wintjes, J. A. Smeitink, J. J. G. Geurts, H. E. De Vries, P. van der Valk and J. van Horsen (2009). "Enhanced number and activity of mitochondria in multiple sclerosis lesions." Journal of Pathology **219**(2): 193-204.
- Wright, J. W. and J. W. Harding (2009). "Contributions of matrix metalloproteinases to neural plasticity, habituation, associative learning and drug addiction." Neural Plast **2009**: 579382.
- Wu, G. F. and E. Alvarez (2011). "The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis." Neurologic Clinics **29**(2): 257-278.
- Yamasaki, R., H. Lu, O. Butovsky, N. Ohno, A. M. Rietsch, R. Cialic, P. M. Wu, C. E. Doykan, J. Lin, A. C. Cotleur, G. Kidd, M. M. Zorlu, N. Sun, W. Hu, L. Liu, J. C. Lee, S. E. Taylor, L. Uehlein, D. Dixon, J. Gu, C. M. Floruta, M. Zhu, I. F. Charo, H. L. Weiner and R. M. Ransohoff (2014). "Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system." J Exp Med **211**(8): 1533-1549.
- Yang, Q. H., M. J. Khoury, J. M. Friedman, J. Little and W. D. Flanders (2005). "How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population?" International Journal of Epidemiology **34**(5): 1129-1137.
- Yeo, T. W., P. L. De Jager, S. G. Gregory, L. F. Barcellos, A. Walton, A. Goris, C. Fenoglio, M. Ban, C. J. Taylor, R. S. Goodman, E. Walsh, C. S. Wolfish, R. Horton, J. Traherne, S. Beck, J. Trowsdale, S. J. Caillier, A. J. Ivinson, T. Green, S. Pobywajlo, E. S. Lander, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, M. J. Daly, J. R. Oksenberg, S. L. Hauser, A. Compston, D. A. Hafler, J. D. Rioux and S. Sawcer (2007). "A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis." Annals of Neurology **61**(3): 228-236.
- Yilmaz, U., K. Gucuyener, A. Atak, A. Aral, E. Gurkas, E. Demir and A. Serdaroglu (2012). "Matrix metalloproteinase-7 and matrix metalloproteinase-9 in pediatric multiple sclerosis." Pediatr Neurol **47**(3): 171-176.
- Zeman, A. Z., D. Kidd, B. N. McLean, M. A. Kelly, D. A. Francis, D. H. Miller, B. E. Kendall, P. Rudge, E. J. Thompson and W. I. McDonald (1996). "A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **60**(1): 27-30.
- Zhang, B., S. Ye, S. M. Herrmann, P. Eriksson, M. de Maat, A. Evans, D. Arveiler, G. Luc, F. Cambien, A. Hamsten, H. Watkins and A. M. Henney (1999). "Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis." Circulation **99**(14): 1788-1794.
- Zhang, H. Q., H. Adwanikar, Z. Werb and L. J. Noble-Haeusslein (2010). "Matrix Metalloproteinases and Neurotrauma: Evolving Roles in Injury and Reparative Processes." Neuroscientist **16**(2): 156-170.
- Zhang, Y., R. R. Da, L. G. Hilgenberg, W. W. Tourtellotte, R. A. Sobel, M. A. Smith, M. Olek, R. Nagra, G. Sudhir, S. van den Noort and Y. Qin (2005). "Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions." J Neuroimmunol **167**(1-2): 120-130.

- Zhao, H., M. M. Bernardo, P. Osenkowski, A. Sohail, D. Pei, H. Nagase, M. Kashiwagi, P. D. Soloway, Y. A. DeClerck and R. Fridman (2004). "Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation." J Biol Chem **279**(10): 8592-8601.
- Ziabreva, I., G. Campbell, J. Rist, J. Zambonin, J. Rorbach, M. M. Wydro, H. Lassmann, R. J. Franklin and D. Mahad (2010). "Injury and differentiation following inhibition of mitochondrial respiratory chain complex IV in rat oligodendrocytes." Glia **58**(15): 1827-1837.
- Zivkovic, M., T. Djuric, E. Dincic, R. Raicevic, D. Alavantic and A. Stankovic (2007). "Matrix metalloproteinase-9 -1562 C/T gene polymorphism in Serbian patients with multiple sclerosis." J Neuroimmunol **189**(1-2): 147-150.
- Zuvich, R. L., J. L. McCauley, M. A. Pericak-Vance and J. L. Haines (2009). "Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis." Seminars in Immunology **21**(6): 328-333.