



**Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Instituto Biomédico**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular e Celular**



**Fadiga em pacientes com Esclerose Múltipla: análise do
perfil de citocinas e risco de recaídas clínicas**

Marisa da Cunha Sales

Orientadora: Prof^a. Dr^a Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2016

Marisa da Cunha Sales

Fadiga em pacientes com Esclerose Múltipla: análise do perfil de citocinas e risco de recaídas clínicas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cleonice Alves de Melo Bento

Rio de Janeiro

2016

Ficha Catalográfica:

Sales, Marisa da Cunha

Fadiga em pacientes com Esclerose Múltipla: análise do perfil de citocinas e risco de recaídas clínicas/ Marisa da Cunha

Sales – Rio de Janeiro, 2016

xv 57f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) –
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

1. Esclerose Múltipla 2. Fadiga 3. Citocinas

I. Título

Marisa da Cunha Sales

Fadiga em pacientes com Esclerose Múltipla: análise do perfil de citocinas e risco de recaídas clínicas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Banca examinadora:

Dr^a. Carmen Lúcia A. Paiva, Departamento de Genética e Biologia Molecular/UNIRIO

Dr^a. Joelma Freire de Mesquita, Departamento de Genética e Biologia Molecular/UNIRIO

Dr^a Joana Hygino da Silva Machado, Bolsista PNP/PPGBMC

Dr. Arnaldo Feitosa Braga de Andrade, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia/UERJ (suplente)

Dedico este trabalho com muito amor, à minha mãe Isaura (*in memoriam*), que me ajudou a enxergar o verdadeiro sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Victor Hugo pelo amor, paciência, apoio, por sempre acreditar no meu potencial durante a minha jornada e por me incentivar sempre.

Agradeço à minha irmã Carina e à minha cunhada Isabel. Muito obrigada pelo esforço, compreensão, apoio e incentivo de vocês para que este trabalho fosse possível.

Agradeço à minha orientadora, prof^a Cléo, pela amizade, pela paciência, pelo conhecimento e por acreditar em mim e no momento que mais precisei.

Agradeço às professoras Dr^a Carmen Lúcia e Dr^a Joelma Mesquita pela amizade e apoio.

Aos pacientes, por acreditarem que nós, pesquisadores, podemos ajudá-los a diminuir sua dor e a dos outros.

Agradeço à equipe do LILiT - UNIRIO, por ter um ótimo relacionamento e amizade.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação de Biologia Molecular e Celular da UNIRIO, por me proporcionar um ótimo ensinamento.

Às agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPq, pelo apoio financeiro que, sem ele, não conseguiria concluir este trabalho.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Esclerose múltipla	1
1.2.1 Conceito, prevalência, diagnóstico e fenótipos.	1
1.2.2 Incapacidade neurológica na EM.....	2
1.3 Bases imunológicas da EM.....	5
1.3.2 Imunohistopatologia das lesões neuronais	5
1.3.2 Os linfócitos T efetores e a EM.....	6
1.3.3 Distúrbios na regulação imune e a EM.....	12
1.4 Fadiga na EM	16
1.4.1 Características da fadiga	16
1.4.2 Métodos subjetivos para pesquisa de fadiga	16
1.4.3 Mecanismo biológico da fadiga na EM.....	188
1.4.4 Tratamento farmacológico da fadiga na EM.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral.....	22
2.2 Específicos	22
3. METODOLOGIA	23

3.1 Indivíduos estudados	23
3.2 Coleta e purificação de células	23
3.3 Cultura de células mononucleares do sangue periférico e estímulos.....	24
3.4 Determinação de citocinas.....	24
3.5 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Características dos indivíduos estudados, ocorrência de fadiga e sua relação com surtos clínicos.	26
4.2 Níveis de citocinas periféricas em pacientes com EM-RR e sua relação com fadiga..	28
4.3 Correlação entre fadiga e a produção de citocinas relacionadas aos fenótipos Th1, Th17 e de IL-10.	29
4.4 Monócitos de pacientes com EM-RR e fadiga produzem maiores níveis de citocinas relacionadas à indução do fenótipo Th17	32
4.5 Correlação entre severidade de fadiga e a produção de citocinas pelas células T e monócitos de pacientes com EM-RR.....	34
5. DISCUSSÃO.....	37
6. CONCLUSÕES.....	43
7. BIBLIOGRAFIA.....	44
8. ANEXO	57

Lista de figuras

Figura 1. Placas características de lesões por EM mostradas em ressonância magnética.....	5
Figura 2. Atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais nos cérebros de pacientes com EM	6
Figura 3. Indução dos fenótipos efetores de células T mais implicados na esclerose múltipla (EM).	12
Figura 4. As células T reguladoras e a esclerose múltipla.....	15
Figura 5. Ocorrência de fadiga no número de surtos em pacientes com EM-RR.....	27
Figura 6. Níveis de citocinas periféricas e sua correlação entre os níveis plasmáticos de citocinas com a presença e gravidade de fadiga em pacientes com EM-RR.....	29
Figura 7. Ocorrência de fadiga no perfil de citocina produzido pelas células T de pacientes com EM-RR.	31
Figura 8. Ocorrência de fadiga e a produção de citocinas por monócitos de pacientes com EM-RR.	33
Figura 9. Correlação entre fadiga e perfil de citocina produzido pelas células T de pacientes com EM-RR	35

Figura 10. Correlação entre fadiga e perfil de citocina produzido por monócitos de pacientes com EM-RR36

Lista de quadros

Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS.....	3
Quadro 2. Escala Expandida do Estado de Incapacidade (<i>EDSS</i>).....	3
Quadro 3: Questionário da escala de severidade de fadiga (FSS)	17

Lista de tabelas

Tabela 1: Estudos de fadiga subjetiva na EM com as escalas FSS e MFIS.....17

Tabela 2. Características dos pacientes com EM-RR fatigados ou não.....26

Lista de abreviaturas

- APC – células apresentadoras de antígeno
- AR - artrite reumatoide
- CIS - Síndrome Clínica Isolada
- CMSP - células mononucleares do sangue periférico
- CO₂– dióxido de carbono
- CTLs – do inglês, cytotoxic T lymphocytes
- DCs – células dendríticas
- EAE – do inglês, experimental autoimmune encephalomyelitis
- EAO - espécies ativadas do oxigênio
- EDSS - do inglês, expanded disability status scale
- ELISA - do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
- EM - esclerose múltipla
- EMPP - esclerose múltipla progressiva primária
- EMPS - esclerose múltipla progressão secundária
- EM-RR - esclerose múltipla remitente recorrente
- FDS - escala descritiva da fadiga
- FoxP3 – do inglês, forkhead winged helix
- FS – escala de fadiga
- FSMC - escala de fadiga para funções motora e cognitiva
- FSS - Escala de severidade de fadiga
- GM-CSF – do inglês, granulocyte-macrophages colony-stimulating fator
- HC – hidrocortisona
- IFN - interferon
- IgG – Imunoglobulina do tipo G
- IL - interleucina
- iTreg – do inglês, induced T regulatory cells
- LPS - lipopolissacarídeo
- MFIS - Escala do impacto da fadiga
- MHC – do inglês, major histocompatibility complex

MMPs - metaloproteinases
MOG - do inglês, myelin oligodendrocyte glycoprotein
NFI-MS - índice neurológico de fadiga em esclerose múltipla
NK – do inglês, natural killer
nTregs - do inglês, natural T regulatory cells
ON - óxido nítrico
PAMPs – do inglês, pathogen-associated molecular pattern
PASSAT - teste auditivo compassado de adição seriada
PHA - fitohemaglutinina
RM - ressonância magnética
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
RR – risco relativo
SNC - sistema nervoso central
tDCs – células dendríticas tolerogênicas
TGF- β – fator de crescimento transformado- β
Th – célula T helper ou do tipo auxiliadora
TNF – fator de necrose tumoral
Tr - células T reguladoras

RESUMO

A fadiga é o sintoma “fantasma” mais frequente nos pacientes com esclerose múltipla (EM), uma doença autoimune mediada pelas células T dirigida contra antígenos da bainha de mielina dos neurônios do sistema nervoso central. O objetivo do presente estudo foi avaliar o impacto da fadiga no perfil de citocinas em pacientes com EM e sua relação com o risco de novas recaídas clínicas por um período de 2 anos de seguimento clínico. Para o nosso estudo amostras de sangue periférico de pacientes com EM com (n=15) e sem (n=15) fadiga foram colhidas para obtenção dos plasmas e células mononucleares. As citocinas presentes nos plasmas e liberadas por linfócitos T, ativados com fitohemaglutinina A (PHA), ou por monócitos, estimulados com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, foram dosadas usando a técnica ELISA. Em nosso estudo, o papel do corticoide em inibir a produção de citocinas inflamatórias pelas células T e monócitos foi avaliado através da adição de diferentes doses de hidrocortisona (HC) no início da cultura. Algumas informações quanto às características dos pacientes, o grau de incapacidade neurológica e a ocorrência de surtos após as análises imunológicas foram obtidas à partir dos prontuários médicos. Em nosso estudo, os níveis periféricos de IL-6 e TNF- α , assim como a produção *in vitro* de citocinas relacionadas aos fenótipos Th17 (IL-6, TNF- α , IL-17, IL-22 e GM-CSF) e Th1 (IFN- γ), foram significativamente maiores nos pacientes com fadiga. O mesmo fenômeno foi observado entre a produção de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-23 pelos monócitos e fadiga. A severidade da fadiga, determinada pela escala FSS, foi positivamente correlacionada à produção de citocinas inflamatórias particularmente relacionadas ao fenótipo Th17 (IL-17, IL-22, IL-6, IL-1 β e IL-23). Adicionalmente, durante o seguimento clínico, a ocorrência de novos surtos foi significativamente superior no grupo de pacientes com fadiga e foi relacionado à produção de IL-6 e IL-22 durante a fase de remissão clínica. Apesar da produção de IL-10 ter sido maior nos pacientes com fadiga, seus níveis não foram relacionados à pontuação FSS. Finalmente, a habilidade da HC em inibir a produção de citocinas inflamatórias foi menor nas culturas de células dos pacientes com fadiga. Em resumo, nossos dados, apesar de preliminares, sugerem que a ocorrência de fadiga, por favorecer a produção de citocinas relacionadas aos fenótipos Th1 e Th17, impacta de forma negativa o curso da EM.

ABSTRACT

Fatigue is a "ghost" symptom more frequent in patients with multiple sclerosis (MS), an autoimmune disease mediated by T cells directed against myelin antigens of central nervous system neurons. The aim of this study was to evaluate the impact of fatigue on the cytokine profile in patients with MS and its relationship to the risk of additional clinical relapses for a period of 2 years of follow up. For this study, samples of peripheral blood of MS patients with (n = 15) and without (n = 15) fatigue were collected to obtain plasma and mononuclear cells. Cytokines present in both plasma and released by T lymphocytes, activated with phytohemagglutinin A (PHA), or monocytes, stimulated with lipopolysaccharide (LPS), were measured by using the ELISA technique. In our study, the role of corticosteroids in inhibiting the production of inflammatory cytokines by T cells and monocytes was evaluated following addition of different doses of hydrocortisone (HC) at the beginning of the culture. Some information about the patient characteristics, neurological disability scores and bouts after immunoassays were obtained from medical records. In our study, peripheral levels of IL-6 and TNF- α , as well as *in vitro* production of cytokines related to Th17 (IL-6, TNF- α , IL-17, IL-22 and GM-CSF) and Th1 (IFN- γ) phenotypes, was significantly higher in patients with fatigue. The same phenomenon was observed between IL-6, TNF- α , IL-1 β and IL-23 production by monocytes and fatigue. The severity of fatigue, determined by the FSS score, was positively correlated with the Th17-related cytokines production (IL-17, IL-22, IL-6, IL-1 β and IL-23). Furthermore, during follow-up, the occurrence of new bouts was significantly higher in patients with fatigue and it was linked to the IL-6 and IL-22 production during clinical remission phase. Despite the production of IL-10 was higher in patients with fatigue, their levels were not related to the FSS score. Finally, the ability of HC in inhibiting the *in vitro* inflammatory cytokines production was lower in patients with fatigue. In summary, our data, although preliminary, suggest that the occurrence of fatigue, by favoring the production of Th1- and, mainly, Th17-related cytokines affects negatively the course of MS.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante inflamatória de fundo autoimune mediada principalmente pelas células T efetoras dirigidas contra antígenos da bainha de mielina do sistema nervoso central (SNC). Por afetar qualquer área do SNC, a EM leva a uma incapacidade substancial do indivíduo devido a déficits das funções sensoriais, autonômicas, cognitivas e motoras (Milo & Miller, 2014). Entretanto, a fadiga é o sintoma “fantasma” mais frequente da EM sendo descrita pelos pacientes como mais incapacitante que a própria limitação física (Asano *et al.*, 2015). A fadiga agrava as disfunções neurológicas preexistentes, limita as atividades da vida diária, interfere no trabalho e reduz a qualidade de vida (Asano *et al.*, 2015).

A partir de uma revisão sistemática da literatura, vários trabalhos têm confirmado uma alta prevalência de fadiga motora e cognitiva em pacientes com EM (Alvarenga-Filho *et al.*, 2010). Classicamente, a fadiga é acompanhada da produção de citocinas inflamatórias, e o impacto dessa exaustão física e mental no comportamento funcional das células T e nos parâmetros clínicos nos pacientes com EM não foram ainda estudados. Esse tipo de investigação é importante pois pode fornecer valiosas pistas sobre os mecanismos pelos quais a fadiga pode impactar no risco de progressão da doença, principalmente no cenário atual em que as drogas usadas no tratamento da EM se mostram ineficazes no manejo clínico da fadiga.

1.2 Esclerose múltipla

1.2.1 Conceito, prevalência, diagnóstico e fenótipos.

A EM é uma condição imunomediada crônica e a causa mais frequente de incapacidade em adultos jovens (20 a 40 anos de idades), afetando aproximadamente 2.800.000 pessoas em todo o mundo (MSIF, 2013), sendo a maioria indivíduos caucasianos que habitam países do hemisfério norte (> 350/100.000) (Wade, 2014). O Brasil situa-se em área de baixo risco, com

prevalência média de 8.5/100.000 habitantes (1.2/100.000 - 30/100.000) (da Gama Pereira *et al.*, 2015).

Classicamente, a EM tem início como uma Síndrome Clínica Isolada (CIS), que representa o primeiro surto da doença e se manifesta principalmente por neurite óptica, síndrome de tronco cerebral e mielite parcial (Miller *et al.*, 2008). Após a CIS, a grande maioria dos pacientes evoluem para a forma remitente recorrente (RR) da EM (EM-RR), que é caracterizada pela ocorrência de recaídas clínicas ao longo da doença. O diagnóstico clínico de EM é fechado após dois surtos clínicos que ocorrem em diferentes áreas do SNC e em diferente tempo (disseminação no tempo e no espaço). Ademais, é possível definir o diagnóstico de EM em pacientes com CIS utilizando critérios de ressonância magnética (RM), a partir da demonstração de novas lesões inflamatórias em diferentes áreas do SNC em diferentes tempos após o primeiro surto. No entanto após o diagnóstico definitivo de EM-RR, não é possível determinar qual será a frequência e gravidade dos surtos posteriores, ou se ocorrerá progressão secundária (EMPS). A forma progressiva primária (EMPP) é rara e caracteriza-se por início insidioso e curso progressivo (Lublin, 2014).

1.2.2 Incapacidade neurológica na EM

A incapacidade neurológica marca a gravidade da EM-RR e resulta de surtos em decorrência da presença de atividade inflamatória aguda multifocal e recorrente atingindo o SNC. As recaídas são caracterizadas clinicamente por manifestações neurológicas agudas com duração mínima de 24 horas seguidos de remissão completa ou parcial. Entretanto, a manutenção do estado de incapacidade por mais de 6 meses é indicativo de uma atividade inflamatória neurodegenerativa e tem sido relacionada à progressão (Confraveux & Compston, 2006).

Seguindo a avaliação da extensão dos distúrbios nos sistemas funcionais (SF, Quadro 1), os pacientes com EM são estadiados utilizando a escala expandida do estado de incapacidade, ou EDSS (do inglês *Expanded disability status scale*) (Kurtzke, 1983). A pontuação da escala EDSS varia de 0 a 10 e leva em consideração principalmente o grau de comprometimento motor do paciente (Quadro 2).

Quadro 1. Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da escala EDSS

-
- ✓ Funções Piramidais - movimento voluntário
 - ✓ Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face, deglutir.
 - ✓ Funções Visuais (ou Ópticas)
 - ✓ Funções Cerebrais (ou Mentais)- memória, concentração, humor
 - ✓ Funções Cerebelares - coordenação do movimento ou equilíbrio
 - ✓ Funções Sensitivas
 - ✓ Funções Intestinais e Vesicais
 - ✓ Outras Funções - incluindo a fadiga
-

Limitações em caminhar são prevalentes e constituem um desafio nesta população (Pilutti *et al.*, 2013). As limitações ao caminhar têm consequências e repercussões sobre a atividade de vida diária do paciente, emprego e qualidade de vida. Dados da coorte de Lyon (França) indicam que com 10 anos de doença, 53% dos pacientes alcançaram EDSS 4 (múltiplas disfunções neurológicas, porém andando 500 metros sem repouso), 28 % atingem EDSS 6 (marcha com apoio unilateral no mínimo por 100 metros sem repouso), e 15% chegam ao EDSS 7 (marcha com apoio limitada a ≥ 10 metros). Com 40 anos de doença todos os pacientes alcançaram EDSS 4.0, 77% EDSS 6.0 e 67% EDSS 7 (Confavreux *et al.*, 2000).

Quadro 2. Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)¹

-
- 0.0** - Exame neurológico normal (SF grau 0).
 - 1.0** - Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 SF (1 SF 1).
 - 1.5** - Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 SF, excluindo função cerebral grau 1 (mais de 1 SF 1).
 - 2.0** - Deficiência mínima em 1 SF (1 SF 2, outros 0 ou 1).
 - 2.5** - Deficiência mínima em 2 SF (2 SF 2, outros 0 ou 1).
 - 3.0** - Deficiência moderada em 1 SF (1 SF 3, outros 0 ou 1) ou deficiência leve em 3 ou 4 SF (3 ou 4 SF 2, outros 0 ou 1), embora com marcha livre.
 - 3.5** - Marcha livre mas com deficiência moderada em 1 SF (1 SF 3) e 1 ou 2 SF 2, ou 2 SF 3, ou 5 SF 2 (outros 0 ou 1).
 - 4.0** - Marcha livre sem órtese, independente, por 12 h/dia apesar de deficiência relativamente severa de 1 SF 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo os limites dos passos anteriores, capaz de andar sem auxílio e sem descanso por 500 metros.
-

-
- 4.5** - Marcha livre sem auxílio durante grande parte do dia, capaz de trabalhar o dia todo, pode, contudo, ter alguma limitação para atividade livre ou requerer mínima assistência; caracterizado por deficiência relativamente severa consistindo de 1 SF 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores e marcha livre por 300 metros.
 - 5.0** - Marcha livre por 200 metros; deficiência severa atrapalhando as atividades diárias; geralmente 1 SF 5 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores.
 - 5.5** - Marcha livre por 100 metros; deficiência severa para impedir as Atividades de Vida Diária (AVD), (1 SF 5, outros 0 ou 1).
 - 6.0** - Auxílio intermitente ou unilateral (bengala, muleta, aparelho tutor, órtese) necessário para andar 100 metros com ou sem descansar (+ de 2 SF 3).
 - 6.5** - Auxílio bilateral constante para andar 20 metros (+ de 2 SF 3).
 - 7.0** - Incapaz de andar 5 metros mesmo com auxílio, necessita de cadeira-de-rodas (CR) comum e faz transferência sozinho, toca a CR por 12 h/dia (= de 1 SF 4; muito raramente só 1 SF 5).
 - 7.5** - Incapaz de andar mais que poucos passos, restrito à CR, pode precisar de auxílio para transferência, toca a CR, mas não pode se manter na CR comum o dia todo. Pode necessitar de CR motorizada (+ de 1 SF 4+).
 - 8.0** - Essencialmente restrito ao leito ou CR, pode ficar na CR boa parte do dia, mantém muitos cuidados pessoais, geralmente tem o uso efetivo dos membros superiores (SF 4 em muitos sistemas).
 - 8.5** - Restrito ao leito boa parte do dia, tem alguma função de membros superiores; mantém alguns cuidados pessoais (SF 4 em vários sistemas).
 - 9.0** - Dependente no leito; pode se comunicar e se alimentar (SF 4 na maioria).
 - 9.5** - Totalmente dependente no leito, incapaz de deglutir ou se alimentar (todos os SF 4 ou 5).
 - 10,0** - Morte por Esclerose Múltipla
-

¹ Expanded Disability Status Scale

Outro aspecto muito importante a ser considerado são os déficits cognitivos associados à EM. Um déficit cognitivo primário neste caso é considerado um comprometimento na habilidade de processar as informações com a rapidez de indivíduos saudáveis. A avaliação clínica da velocidade do processamento da informação confronta-se, no entanto, com o fato de que poucos testes neuropsicológicos são eficazes para realizar esta medida. Entre eles, destaca-se o PASSAT (Teste auditivo compassado de adição seriada). A base lógica sob o PASSAT consiste em estimular o sistema de processamento de informação utilizando apresentação de estímulos a cada momento mais rápidos até que o indivíduo não seja mais capaz de fornecer uma resposta eficiente. As tarefas envolvem uma série de apresentações auditivas de números em dígitos únicos e instruir o paciente a adicionar os dois números mais recentes e dizer em voz alta a soma durante o intervalo Inter estímulo (Tombaugh *et al.*, 2010).

1.3 Bases Imunológicas da EM

1.3.1 Imunohistopatologia das lesões neuronais

A EM é caracterizada por desmielinização, inflamação multifocal, perda axonal e de oligodendrócitos (Adams & Victor, 1989). Macroscopicamente, as lesões são identificadas na RM como placas de coloração cinza de tamanhos variados (Adams & Victor, 1989) (Figura 1). As placas antigas apresentam-se bem demarcadas, enquanto as mais novas, por causa do edema, possuem limites imprecisos. Em casos de longa duração, nota-se atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais (Figura 2).

Achados a partir das amostras de tecido cerebral e medular de necropsia de pacientes revelaram um acúmulo perivascular de células T CD4⁺ e T CD8⁺, monócitos e células B ocasionais com infreqüentes plasmócitos e anticorpos específicos contra a mielina (Steinman, 2001; Genain *et al.*, 1999; Mattson, Roos & Arnason, 1980; Esiri, 1977). Ademais, linfócitos T podem ser encontrados na substância branca aparentemente normal adjacente às lesões agudas. Por outro lado, os macrófagos são mais proeminentes no centro das placas contendo debris de mielina onde a contagem de oligodendrócitos é reduzida (Lucchinetti *et al.*, 2000). Nas lesões ativas crônicas, o infiltrado inflamatório celular é menos proeminente e é largamente restrito à borda da placa, sugerindo a presença de uma atividade inflamatória basal (Lucchinetti *et al.*, 2000). Finalmente, placas com evidência escassa de inflamação são também descritas como lesões crônicas inativas (Lucchinetti *et al.*, 2000).

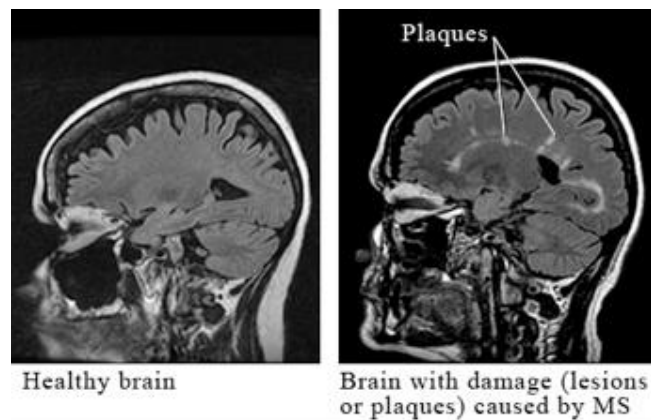


Figura 1. Placas características de lesões por EM mostradas em ressonância magnética (fonte: <https://myhealth.alberta.ca/health/pages/conditions.aspx?hwid=zm6056>)

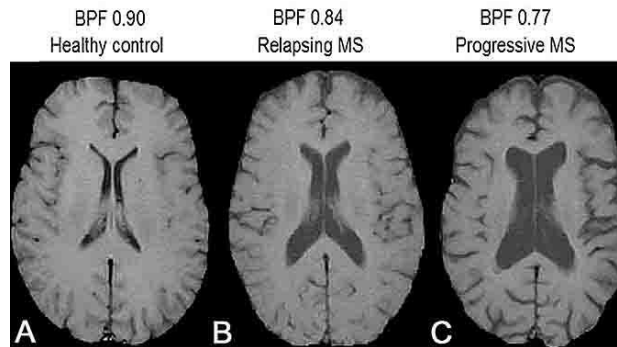


Figura 2. Atrofia cerebral com alargamento dos ventrículos laterais nos cérebros de pacientes com EM (fonte: <http://multiple-sclerosis-research.blogspot.com/2015/01/education-whats-mri.html>)

Apesar desses achados revelarem o envolvimento de diferentes células do sistema imune inato e adquirido na gênese das lesões neuronais, a maioria das pesquisas em imunopatologia da EM envolve particularmente o estudo do papel de diferentes subtipos de células T na progressão da doença e na resposta à terapêutica.

1.3.2 Os linfócitos T efetores e a EM

Doenças autoimunes são resultado de uma reação dos linfócitos T e B a antígenos expressos em tecidos próprios devido a falhas nos mecanismos de tolerância. Entretanto, inerente a sua complexidade, o desenvolvimento de doenças autoimunes depende de interações entre fatores ambientais com suscetibilidade genética do indivíduo (Ceccarelli et al., 2016; Vojdani, 2014). Portanto, devido ao nosso escasso conhecimento à cerca das bases moleculares envolvidas nessa relação complexa, o tratamento atual para muitas desordens autoimunes envolve o uso de drogas imunossupressoras potentes e de ampla ação, tornando os pacientes mais suscetíveis a doenças infecciosas e neoplasias.

Com relação aos mecanismos básicos de autoagressão, mesmo em doenças autoimunes de base humoral, o principal tipo celular envolvido é o linfócito T autorreativo. Portanto, a grande maioria dos estudos sobre os eventos imunes da autoimunidade é centrado no comportamento das células T, tal como, na EM.

Na dinâmica da resposta imune, acredita-se que a EM inicie com a ativação das células T específicas para peptídeos da proteína mielina nos gânglios cervicais por eficientes células apresentadoras de antígeno (APC, *antigen presenting cells*), particularmente as células dendríticas (DCs, *dendritic cells*).

As DCs surgem de precursores da medula-óssea e são consideradas as melhores APCs do sistema imune. As DCs, quando expostas a diferentes estímulos inflamatórios, tais como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular pattern*) e algumas citocinas, são capazes de ativar as células T virgens durante uma resposta imune primária.

Uma eficiente ativação primária das células T depende de diferentes sinais liberados pelas DCs maduras durante a sinapse imunológica nos órgãos linfoides secundários (Henrickson & Von Adrian, 2007; Dustin *et al.*, 2006). O primeiro sinal fornecido pelas DCs é a apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do complexo de histocompatibilidade principal, ou MHC (*major histocompatibility complex*). Essa fase da resposta imune é fundamental, pois permite o reconhecimento, por parte dos linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺, de diferentes peptídeos acoplados às moléculas do MHC de classe II ou I, respectivamente. Entretanto, uma ativação eficiente dos linfócitos T contra micro-organismos requer que as DCs maduras enviem um segundo sinal que é inespecífico ao tipo de antígeno. Esse segundo sinal é mediado por pares de moléculas co-estimuladoras, como por exemplo, moléculas pertencentes aos membros da família B7 (CD80 e CD86), expressos na superfície das DCs, que se ligam às moléculas CD28 dos linfócitos T. O engajamento desses dois sinais, primeiro e segundo, permite a produção de interleucina (IL)-2 pelas células T-antígenos específicas com consequente linfoproliferação (Henrickson & Von Adrian, 2007; Dustin *et al.*, 2006).

Seguindo a ativação, um terceiro sinal, deflagrado principalmente por mediadores solúveis secretados pelas DCs, induz a diferenciação desses linfócitos T clássicos em diferentes fenótipos que produzirão padrões polarizados de citocinas capazes de regular e coordenar uma variedade de respostas imunes. Vários fatores liberados pelas DCs influenciam a diferenciação final de linfócitos T ativados, mas algumas citocinas parecem ser imperativas no destino do fenótipo diferenciado.

No contexto da EM, uma vez ativada nos gânglios linfáticos para-cervicais pelas DCs, as células T mielina-específicas adquirem a capacidade de infiltrar no parênquima cerebral, aonde coordenam uma resposta agressiva à bainha de mielina, resultando nos sintomas neurológicos típicos da EM (Adams & Victor, 1989).

Células T auxiliaadoras do tipo 17, ou Th17, é um novo subtipo de células T CD4⁺ induzido pelas DCs capazes de produzir, como terceiro sinal, IL-1 β , IL-6 e principalmente IL-23 (Matsuzaki & Umemura, 2007). Quando ativadas, as células Th17 não apenas produzem IL-17, mas também secretam as citocinas IL-21, IL-22 e TNF- α que, juntas, coordenam uma resposta inflamatória caracterizada principalmente pela intensa infiltração de neutrófilos para a área de lesão (Crozat *et al.*, 2009) (Figura 3).

Apesar das células Th17 serem necessárias para o controle de infecções por bactérias extracelulares e fungos (Matsuzaki & Umemura, 2007), esse mesmo subtipo celular tem sido ligado a várias doenças autoimunes órgãos-específicas (Miossec, 2009).

Com relação ao comportamento das células T encefalitogênicas na EM, vários estudos no modelo experimental da doença, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*) têm sugerido o envolvimento central de células Th17 nas lesões cerebrais (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011) (Figura 3).

Algumas evidências apontam para o envolvimento da IL-17 na EM. Elevada expressão de RNA mensageiro para a IL-17 em linfócitos perivasculares e nas áreas de lesões cerebrais ativas dos pacientes com EM têm sido descrita (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Lock *et al.*, 2002; Matusevicius *et al.*, 1999). Ainda, estudo por Kebir e colaboradores (2009) demonstrou que células endoteliais humanas do complexo coroide expressam níveis elevados de receptores para IL-17 e, portanto, podem favorecer a infiltração de células Th17 no SNC dos pacientes com EM. Ademais, expressão elevada de IL-17 também tem sido detectada nas células T do sangue periférico de pacientes com EM durante as crises de déficits neurológicos (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011). De forma interessante, mesmo estando na fase de remissão clínica, alguns estudos têm demonstrado uma expansão do fenótipo

típico Th17 nos pacientes com EM quando comparado a indivíduos saudáveis (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011) (Figura 3).

No contexto da EM, elevados níveis das citocinas liberadas pelas células Th17 devem induzir os fagócitos locais a produzir em níveis elevados de radicais livres e de metaloproteinases de matriz (MMPs) com potencial de causar dano neuronal característico da doença (Miossec, 2009). De fato, níveis séricos e liquorícos elevados de MMP-9 nos pacientes com EM foram diretamente relacionados com o rompimento da barreira hematoencefálica e a atividade clínica e radiológica da doença (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011).

Apesar do envolvimento das células Th17 na EM, o IFN- γ , importante citocina produzida por células Th1, parece também contribuir na resposta inflamatória durante as recaídas clínicas dos pacientes com EM (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011) (Figura 3).

Células Th1 representam um subtipo funcional de células T CD4⁺ induzido pelas DCs através da secreção de IL-12 (Zhu, Yamane & Paul, 2010). Os linfócitos Th1, quando ativados, secretam grandes quantidades de IL-2 e interferon (IFN)- γ , e mediam uma resposta conhecida como imunidade celular, por envolver, majoritariamente, a ativação de fagócitos. O IFN- γ , porém, não apenas aumenta o poder microbicida dos fagócitos humanos (macrófagos e neutrófilos), como também amplifica a função lítica das células assassinas naturais (NK – *natural killer*) e a produção de anticorpos das classes IgG1 e IgG3 pelos linfócitos B humanos (McKinstry *et al.*, 2010). Os eventos envolvidos na resposta imune celular são fundamentais para controlar todas as bactérias e protozoários que causam infecções intracelulares, mas têm sido igualmente implicados na autoimunidade (Figura 3).

Níveis elevados de IL-12, citocina envolvida na indução do fenótipo Th1, têm sido detectados no sangue periférico de pacientes com EM em crise clínica e têm sido correlacionados ao déficit neurológico, medido pelo EDSS (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Skurkovich *et al.*, 2001). A contribuição do IFN- γ na patogênese da EM pode estar atrelada a sua habilidade em induzir a apoptose das células da neuroglia humana. De fato, a expressão do IFN- γ colocaliza-se com oligodendrócitos em apoptose em pacientes com EM (Kebir *et al.*, 2009) (Figura 3).

Esses resultados sugerem, portanto, que ambos os fenótipos de células T CD4⁺, Th1 e Th17, contribuem para a progressão da doença. Entretanto, apesar da IL-22 ter sido descrita originalmente como um produto secretado pelas células Th17, células T CD4⁺ capazes de produzir IL-22 na ausência de IL-17 têm sido descritas recentemente descritas em doenças autoimunes, tal como psoríase (Jia & Wu, 2014; Skurkovic *et al.*, 2001). No contexto da EM, estudo por Rolla e colaboradores (2014) demonstrou elevada frequência de células Th22 específicas para proteínas da mielina no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano precedendo os surtos agudos de incapacidade neurológica em pacientes com EM.

Trabalhos mais recentes também têm relacionado o caráter encefalitogênico das células Th1 e Th17 na EM com a capacidade desses linfócitos produzirem GM-CSF (*granulocyte-macrophages colony-stimulating factor*), um fator hematopoiético de crescimento para granulócito e monócitos/macrófagos capaz de promover a ativação de fagócitos (Behi *et al.*, 2011; Codarri *et al.*, 2011; Cravens, *et al.*, 2011). A expressão de GM-CSF por essas células T é estimulada pelas citocinas IL-23 e IL-1 β secretadas pelas APCs (Behi *et al.*, 2011), e esses linfócitos parecem ser essenciais para o desenvolvimento das lesões no SNC de animais com EAE (Ponomarev *et al.*, 2007). Em humanos, estudo por Rasouli e colaboradores (2015) demonstrou maior frequência de células T GM-CSF⁺ no sangue periférico de pacientes com EM quando comparado às amostras de indivíduos saudáveis. Adicionalmente, a frequência dessas células no sangue periférico caiu em pacientes com EM com boa resposta terapêutica ao interferon- β (Rasouli *et al.*, 2015), uma citocina amplamente usada como droga modificadora do curso da EM. Ademais, uma fração significativa das células T CD4⁺ e T CD8⁺ nas placas de pacientes com EM expressam GM-CSF. Dentro do SNC, o GM-CSF é também altamente expresso na micróglia e macrófagos das placas em atividade (Rasouli *et al.*, 2015). De forma interessante, estudo por Broux e colaboradores (2015) demonstrou que a capacidade da micróglia em produzir IL-15 aumenta a produção local de GM-CSF pelas células T CD4⁺ dos pacientes com EM. Acredita-se que o principal papel do GM-CSF, no contexto da EM, seja aumentar a infiltração de monócitos no SNC.

Finalmente, além das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ capazes de produzir IFN- γ (Tc-1) e IL-17 (Tc-17) devem executar um papel importante na imunopatologia

da EM. Células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs - *cytotoxic T lymphocytes*) específicas para epítomos da mielina restritos ao MHC I apresentaram maior expansão clonal em pacientes com EM do que em indivíduos sadios (Zang et al., 2004), e contam como importante infiltrado nas lesões neuronais.

Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento de novas lesões no SNC tem sido correlacionado, principalmente, com o nível de infiltração medular de células T CD8⁺ periféricas, melhor que de células T CD4⁺ (Bjartmar, Wujek & Trapp, 2003). Os mecanismos lesivos mediados pelos linfócitos TCD8⁺ no processo de desmielinização envolvem a direta liberação de proteínas tóxicas, as perforinas e granzimas associada à secreção de IFN- γ , TNF- α , e IL-17, citocinas que induzem a produção de radicais livres derivados do oxigênio conduzindo a morte dos oligodendrócitos (Bjartmar, Wujek & Trapp, 2003).

Finalmente, apesar da EM ser considerada uma doença autoimune de mediação celular, a presença de bandas oligoclonais no líquido é um achado laboratorial característico. A presença de IgG1 e IgG3 dirigidos contra proteínas da mielina, tal como a glicoproteína de oligodendrócito (MOG, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*), no SNC pode amplificar o dano à bainha de mielina devido a ativação das proteínas da cascata do complemento com a formação de produtos líticos, tal como o complexo de ataque à membrana pela deposição do complexo C5b-C9_n aos depósitos de IgG nas bainhas de mielina (Elliott *et al.*, 2012; Genain *et al.*, 1999; Trotter, Dejong, Smith, 1986).

Apesar de todos esses achados sugerirem a participação de diferentes fenótipos de células T efectoras na EM, o estabelecimento de doenças autoimunes depende de danos funcionais nos mecanismos de regulação imune.

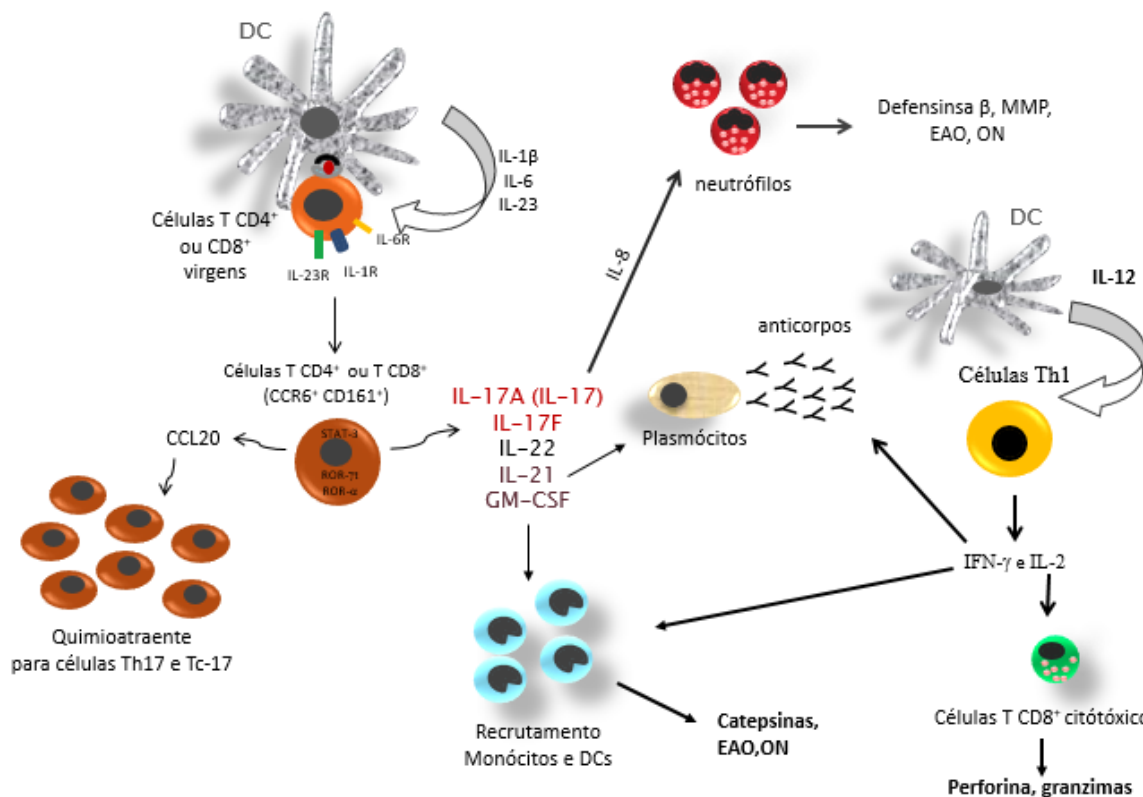


Figura 3. Indução dos fenótipos efetores de células T mais implicados na esclerose múltipla (EM). Na EM, acredita-se que as células dendríticas (DC) profissionais apresentem diferentes peptídeos das proteínas da bainha de mielina do SNC no contexto das moléculas do MHC de classe I e classe II para, respectivamente, os linfócitos T CD8⁺ (conhecidos como linfócitos T citotóxicos) e T CD4⁺ (conhecidas como células T helper). Durante essa sinapse imunológica, moléculas co-estimuladoras CD80/CD86 expressas na superfície das DC interagem com o marcador CD28 expresso nas células T, permitindo assim a indução de diferentes vias de sinalização que culminam com a proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, enquanto a diferenciação das células T humanas nos fenótipos Th17/Tc-17 depende principalmente da produção de IL-23 pelas DC, a formação dos fenótipos Th1/Tc-1 é garantida quando elevadas concentrações de IL-12 são liberadas por essa célula apresentadora de antígeno. As células Th17 e Tc-17, por produzirem elevados níveis de IL-17A (IL-17), IL-22 e GM-CSF, coordenam uma resposta lesiva aos neurônios por favorecer o recrutamento de neutrófilos e, principalmente, monócitos para dentro do parênquima cerebral. Esses fagócitos, quando ativados liberam um conjunto de substâncias neurotóxicas, tais como espécies ativadas do oxigênio (EAO), óxido nítrico (ON), defensinas, catepsinas e metaloproteínas (MMP). Adicionalmente, a produção de IL-2 pelas células Th1 contra antígenos da bainha de mielina pode amplificar dano neuronal por favorecer a diferenciação das células T CD8⁺ em linfócitos T citotóxicos, células que matam o alvo principalmente pela liberação de perforina e granzimas. Finalmente, a produção de anticorpos IgG pelas células B dirigidas contra antígenos da bainha de mielina pode ser favorecida pela ação das citocinas IL-21 e IFN- γ pelos linfócitos Th17 e Th1, respectivamente.

1.3.3 Distúrbios na regulação imune e a EM

Apesar de células T específicas para antígenos da mielina também serem detectadas em indivíduos saudáveis, estas apresentam um fenótipo ativado apenas

no sangue periférico e no líquido de pacientes com EM. Esse achado sugere que mecanismos de regulação estão deficientes em pacientes com EM (Figura 4).

A regulação das respostas mediadas pelos linfócitos T efetores Th1 e Th17 é importante para evitar o desenvolvimento de doenças imunomediadas pela produção excessiva de citocinas inflamatórias (Costantino *et al.*, 2008a e b). Portanto, a regulação das respostas imunes mediadas por esses linfócitos T é fundamental para a manutenção da homeostase, e é principalmente exercida por um conjunto de células T reguladoras. (Vignali *et al.*, 2008) (Figura 4).

Com base na expressão de determinados marcadores, as células T reguladoras consistem em uma população relativamente heterogênea que possui em comum algumas propriedades, tais como hiporresponsividade à estimulação antigênica e função imunossupressora (Saito *et al.*, 2007). Dentre elas, destacam-se as células T reguladoras do tipo 1 (Tr-1 – *regulator T cell type 1*) e, mais recentemente, as células T CD4⁺ reguladoras naturais (nTregs), ambas sendo majoritariamente CD4⁺ (Saito *et al.*, 2007; Aluvihare *et al.*, 2004) (Figura 4).

As células nTregs são primariamente originárias do timo e fenotipicamente expressam grandes quantidades da cadeia α do receptor para a IL-2 (CD25) na superfície associada a baixa expressão de CD127. Intracelularmente essas células são positivas para o marcador FoxP3 (FoxP3 – *forkhead winged helix*), o fator transcricional responsável por regular a expressão de um programa genético envolvido em suprimir a inflamação (Liu *et al.*, 2006; Shevach *et al.*, 2006). Células Tregs ativadas produzem as citocinas anti-inflamatórias fator de crescimento transformado- β (TGF- β – *transformed growth factor- β*), IL-10 e IL-35 (Dieckmann *et al.*, 2001) e suprimem proliferação e função das células T CD4⁺ e T CD8⁺. Adicionalmente, a expressão de níveis elevados do marcador CTLA-4/CD152 na superfície das células Tregs pode inibir, indiretamente, a ativação das células T efetoras por bloquear o segundo sinal enviado pelas DCs. O CD152, ao se ligar às moléculas B7.1/B7.2 (CD80/CD86), inibe as células apresentadoras de antígeno (Lee *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2004; Fallarino *et al.*, 2003; Wing *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2002; Piccirillo & Shevach, 2001).

Apesar de uma origem central, vários artigos têm demonstrado que células nTregs-símiles podem ser obtidas a partir de linfócitos TCD4⁺CD25⁻ virgens quando

ativados por DCs tolerogênicas (tDCs) que são capazes de produzir TGF- β (Walker *et al.*, 2005; Tai *et al.*, 2008; Fantini *et al.*, 2004). Essas Tregs induzidas (iTreg – *induced T regulatory cells*) apresentam o mesmo fenótipo das nTregs e, quando ativadas inibem as respostas inflamatórias tanto por contato, via CTLA-4/CD152, como também pela liberação grandes quantidades de TGF- β e IL-10 (Tai *et al.*, 2008; Polanczyck *et al.*, 2006; Polanczyck *et al.*, 2004).

Os linfócitos Tr-1 representam outra subpopulação que está envolvida na regulação da resposta imune. A diferenciação das células T em Tr-1 depende da secreção de IL-10 pelas tDCs (Mahnke & Enk, 2005). Fenotipicamente, essas células T reguladoras em humanos são identificadas pela coexpressão de CD49b e LAG-3 e pela produção de elevados níveis de IL-10, principalmente quando ativadas via TCR (Gagliani *et al.*, 2013; Levings, Sangregorio & Sartirana, 2002; Roncarolo *et al.*, 2001). A maioria desses linfócitos é do tipo T CD4⁺, mas já foram descritos linfócitos TCD8⁺ Tr-1-símiles (Steinbrink *et al.*, 1999).

No contexto da EM, enquanto alguns pesquisadores não encontraram nenhuma diferença significativa na frequência de linfócitos T reguladores no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes (Michel *et al.*, 2008), vários estudos têm revelado, no entanto, incapacidade dessas células em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efectoras específicas para proteínas da mielina (Falcon, 2009; Ma *et al.*, 2009; Smolders *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2008; Venken *et al.*, 2008; Venken *et al.*, 2007). Essa deficiência funcional pode estar relacionada à menor expressão intracelular da proteína FoxP3 descrita nas células Tregs de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). Ademais, durante os surtos, linfócitos T FoxP3⁺ representam o infiltrado minoritário dentre os leucócitos no cérebro de pacientes com EM (Venken *et al.*, 2007). A menor frequência dessas células no SNC durante o surto pode indicar falha delas em migrar para as áreas de lesão devido a não expressão de moléculas de adesão específicas, reduzida sobrevivência local ou mesmo transformação dessas em células potencialmente encefalitogênicas de fenótipo Th17 (Venken *et al.*, 2007). De modo interessante, o estudo por Michel e colaboradores (2008) sugere que falhas funcionais das células T reguladoras em controlar a reação inflamatória em pacientes com EM seja indireta, isto é, esteja relacionada à elevada produção de citocinas inflamatórias, tais como

IFN- γ e TNF- α , produzidos por linfócitos T efetores que expressam elevados níveis de receptor para a citocina IL-7, o CD127. Nesse estudo a depleção *in vitro* dessas células T CD4⁺CD127⁺⁺ permitiu que os linfócitos Tregs dos pacientes com EM fossem igualmente capazes, quando comparado a indivíduos saudáveis, de inibir resposta inflamatória mediada por células T efetoras.

Esses resultados sugerem que, na verdade, deficiências nos mecanismos de regulação possam estar atrelados à elevada produção de citocinas inflamatórias durante os surtos clínicos dos pacientes com EM, e não a defeitos intrínsecos nos programas genéticos de indução e manutenção dessas células Tregs. Portanto, comorbidades que sabidamente elevam o nível sistêmico de citocinas inflamatórias podem exercer um efeito deletério na EM, tal como a ocorrência de fadiga.

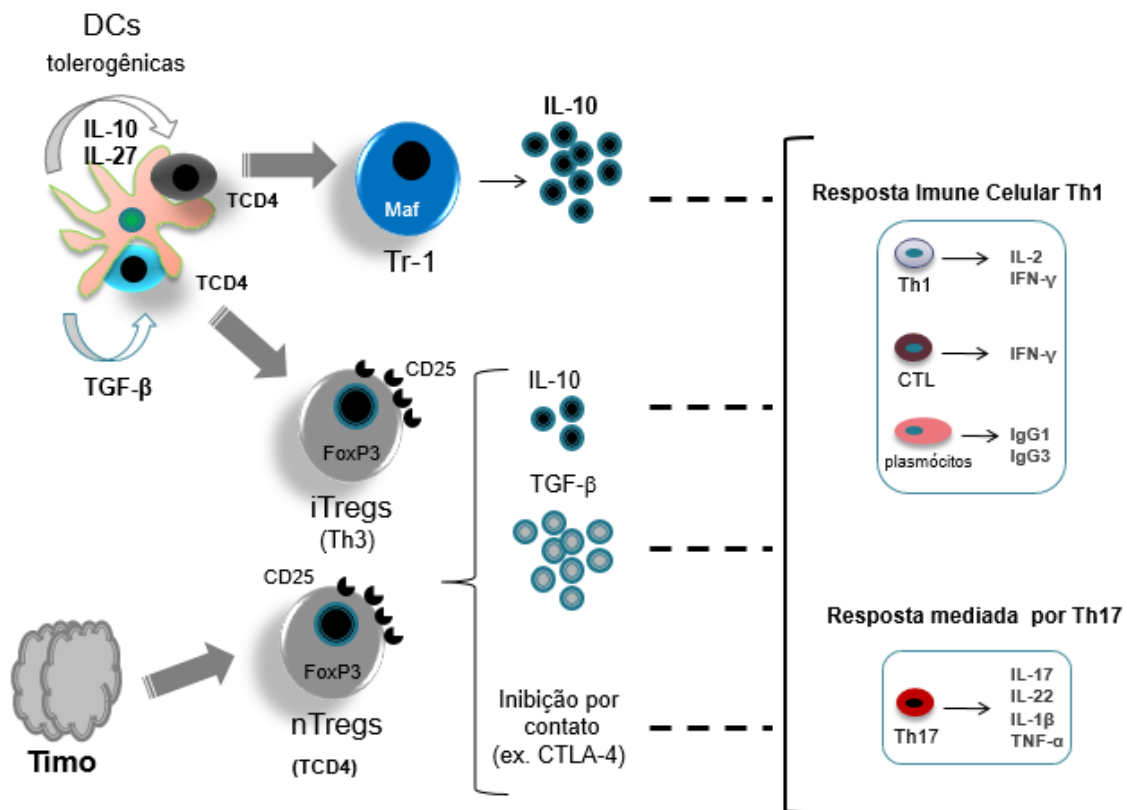


Figura 4. As células T reguladoras e a esclerose múltipla. Durante respostas imunes inflamatórias a produção excessiva de citocinas pelas células Th1 e Th17 patogênicas tem sido atrelada à distúrbios na rede de regulação, principalmente executada pelos linfócitos T reguladores (Tregs). As células Tregs representam uma subpopulação de células T CD4⁺ relativamente heterogênia, sendo as células T CD4⁺FoxP3⁺CD25⁺ o subtipo mais estudado nas doenças autoimunes. Essas células podem ser tanto induzidas (iTregs) na periferia, quando reconhecem os peptídeos específicos apresentados pelas células dendríticas (DCs) tolerogênicas produtoras de TGF- β , quanto geradas naturalmente no

timo (nTregs). Uma terceira subpopulação é induzida por DCs tolerogênicas capazes de produzir elevados níveis de IL-10 e IL-27. Essas células, conhecidas como células T reguladoras do tipo 1 (Tr-1), são negativas para o FoxP3, mas expressam elevados níveis do fator de transcrição Maf. Os mecanismos de ação executados pelas células para controlar reações inflamatórias são diversos e envolvem inibição por contato com a célula alvo efetora (iTreg e nTregs) e/ou através da liberação de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10 e TGF- β . Na EM alguns estudos sugerem comprometimento funcional das células Tregs e a recorrência de surtos clínicos.

1.4 Fadiga na EM

1.4.1 Características da fadiga

Embora a queixa de cansaço excessivo e desproporcional à incapacidade motora tenha sido referido em séries históricas de EM até a década de 90, o sintoma fadiga não havia ainda sido reconhecido como uma das mais frequentes manifestações clínicas da EM e era incluído entre as manifestações da síndrome motora piramidal (Kurtzke, 1970).

O estudo da fadiga na EM iniciou-se por Freal e colaboradores (1984) quando aplicaram um questionário a 309 pacientes com a enfermidade. A quase totalidade dos entrevistados descreveu fadiga como “cansaço ou necessidade de repouso” que é exacerbada com aumento da temperatura ambiental. Citaram também “sonolência” e agravamento das sequelas neurológicas na vigência de fadiga.

A fadiga na EM abrange diversas expressões clínicas, podendo ocorrer ao repouso sob a forma de astenia, no movimento, provocando fatigabilidade patológica, ou durante a fase aguda dos surtos.

1.4.2 Métodos subjetivos para pesquisa de fadiga

O conhecimento sobre frequência, intensidade e características da fadiga na EM só ocorreu após a introdução de autoquestionários e métodos objetivos para avaliação da fadiga motora (Alvarenga-Filho *et al.*, 2010).

As escalas subjetivas apresentam a característica comum de utilizarem questionários auto-aplicáveis e várias vantagens, tais como execução rápida, baixo custo e a possibilidade de serem aplicadas no momento da entrevista, ou serem enviados por diferentes meios de comunicação permitindo assim o estudo de grandes populações. Algumas escalas são unidimensionais, indicando a presença de

fadiga por uma única pontuação, e outras escalas são multidimensionais, pontuando os diferentes tipos de fadiga envolvendo domínios físico, mental e psicossocial.

Embora muitas escalas tenham sido desenvolvidas com a finalidade de avaliar subjetivamente a fadiga na EM, as mais utilizadas são a Escala de severidade de fadiga (FSS) (Krupp *et al.*, 1989) e a Escala do impacto da fadiga (MFIS) (Fisk *et al.*, 1994), com tradução e validação para diferentes línguas, incluindo o português.

A escala de severidade de fadiga (FSS - *Fatigue severity scale*) é um auto questionário composto de nove itens relacionados à gravidade, à frequência e ao impacto sobre a vida diária (Quadro 3). Em cada item o participante escolhe um número entre 1 e 7 que melhor descreva o grau de concordância a afirmação. Um (1) significa que discorda completamente, e 7 que concorda integralmente; 4 não concorda nem discorda. O número total de pontos poderá variar de 9 a 63, sendo valores ≥ 28 indicativos da presença de fadiga e valores ≥ 36 , indicativos de fadiga grave.

Quadro 3: Questionário da escala de severidade de fadiga (FSS)

-
1. Minha motivação é menor quando eu estou fatigado
 2. Exercícios me deixam fatigado
 3. Eu estou facilmente fatigado
 4. A fadiga interfere no meu desempenho
 5. A fadiga causa problemas frequentes em mim
 6. Minha fadiga impede um desempenho físico constante
 7. A fadiga interfere com a execução de certas obrigações e responsabilidades
 8. A fadiga é um dos três sintomas mais incapacitantes que tenho
 9. A fadiga interfere no trabalho, na família ou na minha vida social
-

A partir do questionário FSS aplicado a pacientes com EM, Krupp e colaboradores (1988) demonstraram que 60 a 90% dos pacientes queixaram-se de “exaustão” ou “perda generalizada de energia” e 30% a 40% consideraram estes sintomas a maior carga da doença.

Tabela 1: Estudos de fadiga subjetiva na EM com as escalas FSS e MFIS.

Autor e ano	N	EDSS	Escala	Conclusões
Steens et al., 2012	20	<5.5	FSS	A fadiga percebida foi associada a medidas de fatigabilidade muscular.
Nogueira et al., 2010	30	Leve a grave	FSS	A fadiga ocorreu em 84 % e houve redução de todos os domínios da

Nogueira et al., 2009	61	Leve a grave	FSS	qualidade de vida A fadiga que ocorreu em 69% e as limitações funcionais afetam negativamente a qualidade de vida na EM
Strober, 2005	77	0-8	MFIS	A gravidade da incapacidade prediz a distúrbios do sono também
Kroencke et al., 2000	207	1 a 9	FSS	Fadiga foi altamente correlacionada com depressão e incapacidade
Mendes et al., 2000	95	0 a 6.5	FSS	Fadiga em 67,4% associada com ansiedade, tempo de doença e incapacidade.
Bergamaschi et al., 1997	100	0 a 6	FSS	Significante efeito da gravidade do EDSS na fadiga
Fisk et al., 1994	85	0 a 8.5	MFIS	Apesar da fadiga ser muito frequente na EM, não pode ser prevista por medidas clínicas de incapacidade

FSS: escala de severidade de fadiga; MFIS: escala modificada da ocorrência da fadiga; EDSS: escala expandida de incapacidade.

Outras escalas publicadas, porém, não validadas para a língua portuguesa, analisam aspectos específicos da fadiga na EM. A escala descritiva da fadiga (FDS) valoriza a sensibilidade ao calor (Iriaete *et al.*, 1999). A Escala de fadiga para funções motora e cognitiva (FSMC), organizada em Basel (Suíça), diferencia e gradua fadiga cognitiva e motora por níveis de intensidade (leve, moderada e grave) (Penner *et al.*, 2009). O índice neurológico de fadiga (NFI-MS) utiliza 10 itens do questionário da NFI-MS, abrangendo duas dimensões, a física e a cognitiva (Mills *et al.*, 2010).

1.4.3 Mecanismo biológico da fadiga na EM

Embora a origem da fadiga na EM seja considerada desconhecida, alguns mecanismos primários e secundários têm sido propostos para explicar sua gênese. Entre os mecanismos primários estão descritas alterações da ativação cerebral consequente da perda axonal, da produção de citocinas pró-inflamatórias e de neurotransmissores. Como mecanismos secundários são citados ansiedade e depressão, sedentarismo, câncer, infecções, distúrbios do sono e uso de medicações, em especial interferon beta e drogas psicotrópicas (Braley & Chervin, 2010; Kos *et al.*, 2008; Radbruch *et al.*, 2008).

Evidências a partir de estudos de RM funcional com a técnica de BOLD apoiam

como mecanismo primário da fadiga na EM a perda axonal devido ao processo inflamatório ocasionando, conseqüentemente, um maior recrutamento no número de novas fibras nervosas de áreas corticais no momento da realização de tarefas, sejam elas motoras ou cognitivas (Genova *et al.*, 2013; Rocca *et al.*, 2002).

Um recente estudo realizado na UNICAMP (Damasceno, Damasceno & Cendes, 2015) avaliou a percepção de fadiga pela escala FSS e mediu a atrofia cerebral em RM de 3 Tesla em pacientes com EM de baixa incapacidade e controles saudáveis. Estruturas estriatais exibiram menores volumes em pacientes com fadiga independente do grau de incapacidade neurológica e da presença de sintomas depressivos, dando suporte a teoria de envolvimento de vias córtico-estriadas na fadiga da EM.

O hipotálamo, região importante para regular vigília e sonolência, foi também apontando como uma estrutura envolvida na fadiga induzida pela inflamação em modelos experimentais. Uma hipótese é que neurônios hipotalâmicos que executam um papel importante na vigília e sonolência sejam inibidos pela inflamação, contribuindo assim para a fadiga subjetiva, bem como para o prejuízo em vigília relacionada a fadiga (Kanbayashi, 2011).

Alguns dados clínicos e laboratoriais dão suporte a hipótese da relação entre fadiga na EM com alterações neurofisiológicas do SNC por atuação de citocinas inflamatórias (Flachenecker *et al.*, 2004). A fadiga é um dos efeitos colaterais de curta duração nos pacientes com EM que são tratados com a citocina IFN- β (Neilley *et al.*, 1996; Krupp, 2003). Pokryszko-Dragan e colaboradores (2012) observaram uma relação estreita entre a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ e TNF- α , que são citocinas pró-inflamatórias, com a pontuação da escala de fadiga FSS em pacientes com EM. Um recente estudo multicêntrico publicado por Malekzadeh e colaboradores (2015) demonstraram uma relação direta entre os níveis séricos de IL-6 com a pontuação de fadiga, concluindo os autores que a IL-6 atue na fisiopatologia da fadiga primária na EM. Entretanto, as vias pelas quais as citocinas inflamatórias alteram a conectividade neuronal e levam a fadiga são ainda desconhecidas.

1.4.4 Tratamento farmacológico da fadiga na EM

Apesar de existirem atualmente vários medicamentos disponíveis tanto para controlar as crises agudas de incapacidade neurológica quanto para reduzir o risco de novos surtos, não há evidências de atuação destas drogas no tratamento do sintoma fadiga, ao contrário, algumas delas, como os IFNs, aumentam o sintoma (Braley & Chervin, 2010).

A Amantadina é a droga mais utilizada para tratamento da fadiga na EM. Tradicionalmente é utilizada como anti-viral e no tratamento da Doença de Parkinson. O mecanismo de ação como antiparkinsoniano é desconhecido, embora tenha sido demonstrado que induz um aumento da liberação de dopamina no cérebro. O mecanismo de ação antiviral também não está completamente elucidado mas inibe a replicação viral (Alves-Galvão *et al.*, 2014).

A Pemolina é um fármaco utilizado como estimulante do SNC no tratamento sintomático de transtorno do déficit de atenção e hiperatividade, fadiga crônica, sonolência e narcolepsia. Trata-se de uma amina simpaticomimética de ação central, que atua inibindo a recaptação da dopamina no SNC. Outro fármaco que atua como estimulante do SNC, o Metilfenidato, também é utilizado na fadiga crônica (Breitbart *et al.*, 2001).

Brañas e colaboradores (2000) analisaram os estudos publicados entre 1991 e 1999 com resultados sobre o tratamento da fadiga em pacientes com EM com estas drogas. A Amantadina foi utilizada em quatro estudos, mostrando maior eficácia que placebo, mas a validade clínica destes resultados foi considerada incerta. Uma revisão sistemática da literatura mais recente (Pucci *et al.*, 2007) analisou a eficácia e segurança da Amantadina utilizada por 272 pacientes com EM. Os resultados demonstraram pequenas e inconsistentes respostas favoráveis ao medicamento e vários efeitos colaterais atingindo até 50% dos pacientes. Esses autores concluíram que a eficácia da amantadina na redução da fadiga na EM é pouco documentada, bem como a sua tolerabilidade. Quanto à eficácia da Pemolina, em dois estudos não foram demonstrados efeitos superiores da droga em relação ao placebo no controle da fadiga e ocorreram muitos efeitos adversos.

A pouca eficiência dessas drogas no manejo clínico da fadiga decorre do pouco conhecimento à cerca da fisiopatogenia dessa condição, que parece envolver a

produção de citocinas inflamatórias e, portanto, pode favorecer progressão da EM por alterar o comportamento funcional das células T dos pacientes, uma hipótese ainda não testada.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar se a ocorrência de fadiga nos pacientes com EM-RR pode alterar o comportamento funcional das células T e o risco de recaída clínica.

2.2 Específicos

- Identificar se pacientes com EM-RR fatigados têm maior risco de recaída clínica por um período de 2 anos de observação.
- Avaliar se a fadiga está relacionada com os níveis de citocinas plasmáticas dos pacientes.
- Verificar se a ocorrência e gravidade da fadiga estaria relacionada ao perfil de citocinas produzido pelas células T e por monócitos dos pacientes.
- Correlacionar a fadiga com a sensibilidade das células T e dos monócitos ao tratamento *in vitro* com corticoide.
- Correlacionar a pontuação da escala de fadiga com os níveis de citocinas produzidos pelas células T e monócitos dos pacientes.

3. METODOLOGIA

3.1 Indivíduos estudados

Para o presente estudo, 30 pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla na forma remitente-recorrente (EM-RR) na fase de remissão clínica foram recrutados do ambulatório de Neurologia do Hospital Gaffrée e Guinle/UNIRIO no período de 2014 a 2016. Para evitar fadiga devido à importante incapacidade física, todos os pacientes recrutados com EM-RR tinham EDSS ≤ 2 (Kurtzke, 1983). Os pacientes recrutados não estavam recebendo qualquer tratamento com drogas imunomoduladoras, imunossupressoras, psicotrópicas ou para o tratamento de fadiga. Também foram excluídos pacientes com EM-RR com qualquer outra comorbidade além da fadiga, tais como câncer, outras doenças autoimunes e infecciosas. A presença de fadiga (FSS ≥ 28) e sua severidade foi determinada através da escala de severidade de fadiga (FSS) (Krupp et al., 1989) aplicada ao paciente no momento da coleta de sangue. Os prontuários foram analisados para coletar informações quanto à idade, gênero, tempo de doença e a ocorrência de recaídas (Tabela 2). Vale ressaltar que o número de recaídas foi avaliado por um período de 2 anos e foi definida como o aparecimento de novos sintomas de incapacidade neurológica com duração mínima de 24 h.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da UNIRIO (Anexo) e as amostras de sangue periférico só foram colhidas após cada paciente ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Coleta e purificação de células

Aproximadamente 20 mL de sangue periférico de cada indivíduo recrutado foram colhidos utilizando agulhas e seringas heparinizadas ou tubos estéreis contendo heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Após a coleta, o sangue foi encaminhado para o laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T (LLILIT/IB). A partir do sangue total, os plasmas e as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidos através da centrifugação a 2000 rpm durante

20 minutos da amostra (sangue) sobre um gradiente de separação Ficoll-Hypaque. Enquanto os plasmas foram colhidos e congelados (-20 °C) para futura quantificação de citocinas, as CMSP foram recuperadas, lavadas 2 vezes com solução de HANK e depois submetidas a determinação da viabilidade celular através da contagem de uma alíquota em azul de trypan, utilizando câmara de Neubauer. A concentração de CMSP viáveis utilizada para os experimentos funcionais foi de 1×10^6 células/mL. Para alguns experimentos, para obter monócitos, as CMSP foram deixadas aderir em placas de 24 poços por 1 h em estufa úmida a 37 °C e à 5% de CO₂. Após 1h, os poços foram lavados e as células não aderentes, os linfócitos, foram removidos.

3.3 Cultura de células mononucleares do sangue periférico e estímulos

As CMSP foram cultivadas em placas de 24 poços de fundo chato em 1 mL de meio RPMI 1640 completo. O meio RPMI 1640 é considerado completo quando se adiciona 2mM de L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% de soro fetal bovino, 20 U/ml de penicilina, 20 µg/ml de estreptomicina e 20 mM de tampão HEPES. Para induzir a ativação policlonal das células T, as culturas de CMSP (1×10^6 /mL) foram cultivadas com fitohemaglutinina (PHA, 1µg/mL) por 3 dias. Culturas de monócitos (1 a 2×10^5 /mL) foram estimuladas por 24 h com o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* a 100 ng/mL (sigma, Co). Finalmente, o impacto dos glicocorticoides (utilizado no controle das crises clínicas) nos eventos imunes estudados foi avaliado através da adição às culturas de doses farmacológicas de hidrocortisona (HC, 1×10^{-6} M e 1×10^{-5} M) (Agarwal & Marshall, 1998) (Sigma Chemicals, St Louis, MD). Vale ressaltar que as concentrações de HC usadas no presente trabalho não induzem morte celular, como avaliado pela técnica de exclusão do azul de tripan. Todas as culturas de células foram mantidas em atmosfera úmida a 37 °C e a 5% de CO₂.

3.4 Determinação de Citocinas

A quantificação de diferentes citocinas nos plasmas e nos sobrenadantes das culturas de células contendo células T ou monócitos ativados foi realizada através da técnica de ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) usando os kits BD OptEIA seguindo as instruções do

protocolo fornecido pelo fabricante (BD, Pharmigen, San Diego). Brevemente, 50 μ L dos sobrenadantes (diluídos 1:10), ou dos plasmas, foram adicionados a cada poço contendo anticorpo primário anti-citocina (anticorpo de captura). A placa foi incubada durante 2 horas e, após esse tempo, 100 μ L do anticorpo secundário anti-citocina (previamente tratado com a enzima conjugada estreptavidina-horseradish peroxidase) foram adicionados em cada poço e incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, 100 μ L de substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram adicionados aos poços e a reação foi revelada 30 minutos depois através da adição de uma solução de parada (ácido fosfórico à 1,0 M). As placas foram levadas e submetidas à 450 nm em leitor de ELISA (DynexTechnologies, USA). Para o nosso estudo, foram dosadas as seguintes citocinas: IL-12, GM-CSF, IFN- γ , IL-17, IL-21, IL-22, IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-10. Citocinas humanas recombinantes variando de 4,5-500 pg/mL foram usadas para construir curvas-padrão.

3.5 Análise estatística

Todas as análises estatísticas dos ensaios de dosagem de citocinas foram realizadas utilizando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad). Para determinar se duas variáveis, com distribuição não normal, eram estatisticamente diferentes para cada variável dada, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O teste t de Student foi aplicado para verificar se uma determinada variável, com distribuição normal, era estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. Valores de FSS foram comparados com os parâmetros imunológicos usando a correlação de Spearman. O risco relativo (RR) de recaída clínica ao longo de 2 anos em pacientes com fadiga ou não no momento de entrada no estudo foi calculado de acordo com Altman (1991). Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Características dos indivíduos estudados, ocorrência de fadiga e sua relação com surtos clínicos.

Como mostrado na tabela 2, 30 pacientes com EM-RR, 9 homens e 21 mulheres, com baixo grau de incapacidade neurológica (EDSS variando de 0-2), e na fase de remissão clínica, foram incluídos em nosso estudo. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados quanto a idade, gênero, tempo de doença e nível de incapacidade no início de nosso estudo. Com idade média de 30,5 anos (variando de 21 a 37 anos) e tempo médio de doença de 4,3 anos (variando de 1 a 7 anos), todos os 30 pacientes eram virgens de tratamento com drogas modificadoras da doença. Ademais, nenhum paciente estava sendo tratado para fadiga. Para evitar efeitos residuais dos corticoides, nenhum dos pacientes incluídos tinha tido uma nova crise clínica/radiológica por um tempo mínimo de 3 meses. Para o nosso estudo, os pacientes foram segregados em fatigados ou não, determinada pela pontuação da escala FSS.

Tabela 2. Características dos pacientes com EM-RR fatigados ou não.

	EM-RR ¹	
	Fatigado	Não-Fatigado
N ^o indivíduos (n)	15	15
Homens/mulheres (n)	04/11	05/10
Idade (média ± dp)	28,6 ± 6,1	33,1 ± 8,3
Tempo de doença em anos (méd ± dp)	3,2 ± 4,2	2,8 ± 3,8
EDSS [mediana (variação)]	1 (0-2,0)	1 (0-2)
FSS [média (variação)]	36,9 (28-48)	16,8 (9-27)
Recaídas clínicas (n)	13*	8*

¹Dados dos indivíduos com esclerose múltipla recorrente remitente (EM-RR) fatigados e não fatigados, determinado pela Escala de Severidade de Fadiga (FSS). Na tabela mostra a média de idade (em

anos) de cada grupo no momento em que amostras de sangue periférico foram colhidas para a pesquisa de marcadores imunológicos, assim como o nível de incapacidade neurológica, determinada pela pontuação na escala expandida do estado de Incapacidade (EDSS). No momento da inclusão no estudo, todos os pacientes estavam na fase de remissão clínica e livres de drogas imunomoduladoras/imunossupressores e sem tratamento específico para fadiga. Após 2 anos de seguimento clínico, a ocorrência de surtos foi significativamente maior entre os pacientes do grupo com fadiga (* $p < 0.05$).

Após as análises dos eventos imunes *in vivo* e *in vitro*, que serão apresentados aqui, os pacientes foram acompanhados por 2 anos para determinar a ocorrência de novos surtos clínicos nos dois subgrupos estudados. Como pode ser observado na tabela 2 e na Figura 5, um número maior de pacientes do grupo fatigado teve recaída clínica/radiológica no período de 2 anos de observação. De forma interessante, quando segregados pelo número de surtos, a diferença entre os grupos aumenta. Em dois anos de observação, o número de pacientes com 1, 2 ou 3 surtos foi de 05, 03 e 01 no grupo não fatigado e 03, 04 e 06 nos pacientes com queixa de fadiga. Aplicando a equação de Altman (1991), a fadiga eleva em 1,858 o risco relativo de recaída clínica nos pacientes com EM.

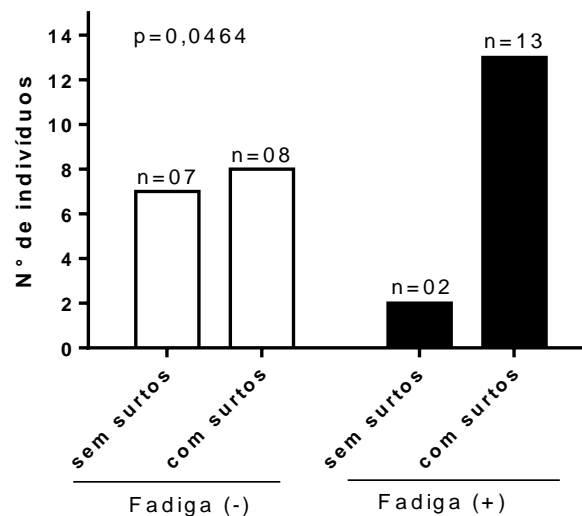
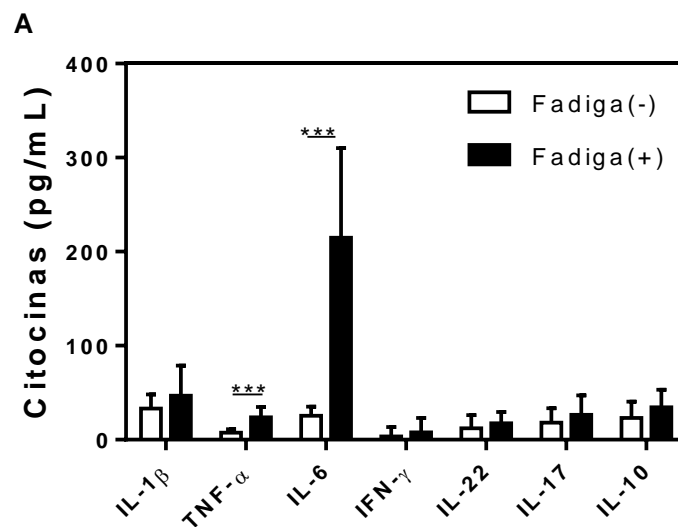


Figura 5. Ocorrência de fadiga na ocorrência de surtos em pacientes com EM-RR. Pacientes fatigados (n=15, FSS \geq 28) ou não (n=15, FSS $<$ 28) foram acompanhados por 2 anos e ocorrência de recaídas clínicas foi determinado através de critérios clínicos e de imagem por ressonância.

4.2 Níveis de citocinas periféricas em pacientes com EM-RR e sua relação com fadiga

Numa tentativa de correlacionar a ocorrência de fadiga com alterações na rede de citocinas inflamatória e anti-inflamatória implicadas na patogênese da EM, os plasmas dos pacientes fatigados ou não foram colhidos e submetidos a dosagem de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-22, IL-17 e IL-10 através da técnica ELISA. Dentre todas as citocinas dosadas, apenas os níveis de TNF- α ($7,6 \pm 3,4$ pg/mL x $23,9 \pm 10,8$ pg/mL, $p < 0.0001$) e IL-6 ($25,5 \pm 9,7$ pg/mL x $214,9 \pm 95,3$ pg/mL, $p < 0.0001$) foram significativamente superiores nos plasmas dos pacientes com fadiga (Fig. 6A). Ademais, como observado na figura 6B, uma forte correlação positiva foi observada entre os níveis de IL-6 e de TNF- α com a severidade da fadiga, determinada pelo FSS. Apesar de não ter atingido um valor de p significativo, foi observada uma tendência entre as concentrações sanguíneas de IFN- γ e IL-10 com o grau de fadiga.



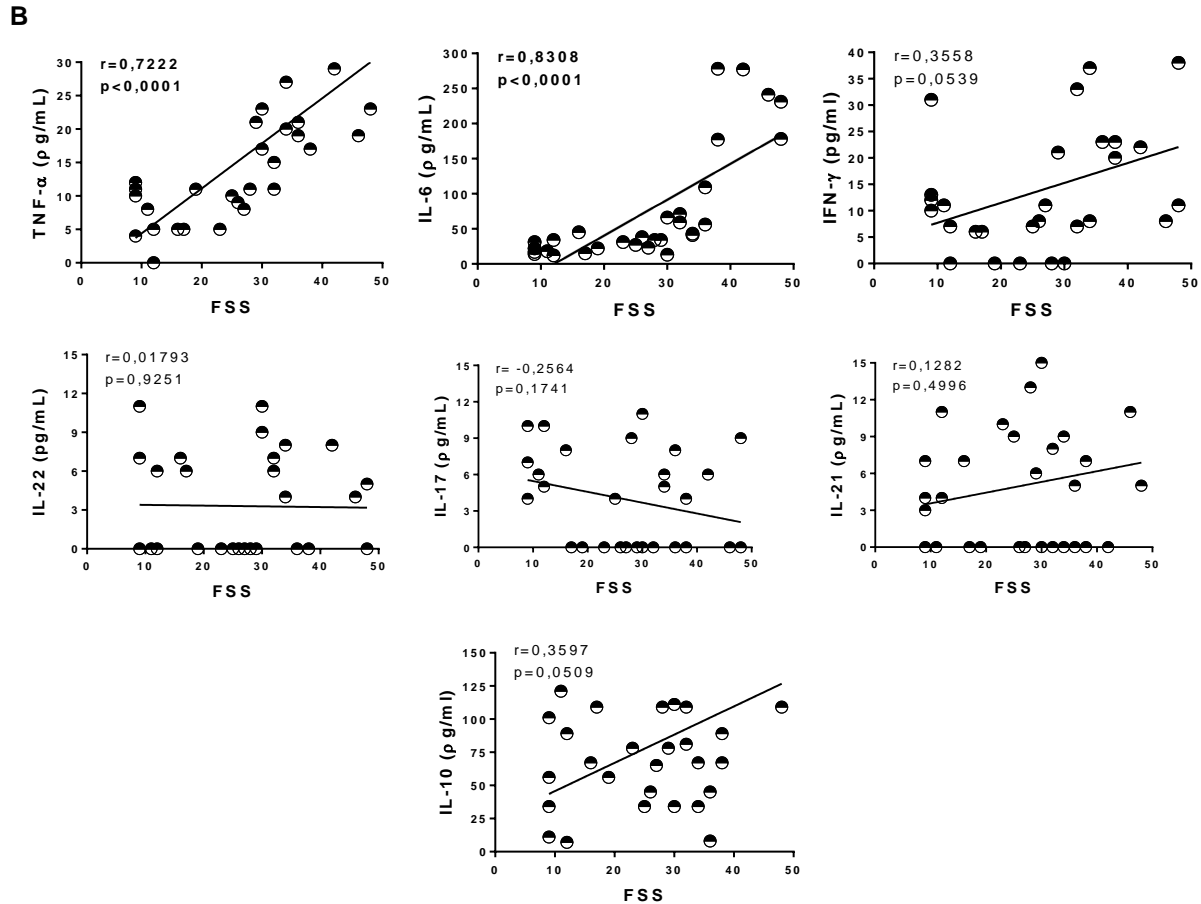


Figura 6. Níveis de citocinas periféricas e sua correlação com a presença e gravidade de fadiga em pacientes com EM-RR. Em (A), citocinas no sangue periférico foram dosadas pela técnica ELISA, (***) indica $p<0,0001$; Em (B) temos a relação entre os níveis dessas citocinas com a presença (FSS \geq 28) e severidade de fadiga em pacientes com EM-RR (n=30).

4.3 Correlação entre fadiga e a produção de citocinas relacionadas aos fenótipos Th1, Th17 e de IL-10.

Resultados anteriores revelaram uma maior produção de TNF- α e IL-6 no sangue periférico dos pacientes com EM e fadiga. Citocinas podem ser produzidas por diferentes células do sistema imune e fora dele. Sabendo que a EM é uma doença autoimune mediada principalmente pelas células T auto-reativas dos fenótipos Th1 e Th17, nosso próximo objetivo foi investigar se a ocorrência de fadiga poderia alterar o nível de citocina produzida pelas células T policlonalmente ativadas em culturas. É importante enfatizar que nenhuma produção de citocina foi detectada nas culturas de células de ambos os grupos de pacientes mantidas apenas na presença de meio de cultura (dados não demonstrados). Como pode ser observado na figura 7, a produção

de quase todas as citocinas relacionadas ao fenótipo Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-6, TNF- α , IL-22, IL-17 e GM-CSF) foi significativamente superior no grupo de pacientes com fadiga. A liberação da IL-10, potente citocina anti-inflamatória, também foi superior nas culturas contendo células T de pacientes fatigados. De forma interessante, de todas essas citocinas, nós observamos que pacientes com valores de IL-6 superiores à 371 pg/mL, ou IL-22 maiores que 609 pg/mL, tinham um RR de 2 e de 3 vezes maior de recaída clínica, respectivamente.

Corticoides são potentes substâncias imunossupressoras amplamente usadas no controle das crises agudas de incapacidade neurológica nos pacientes com EM durante os surtos. No presente estudo, apesar da maior dose de hidrocortisona (HC, 1×10^{-5} M) ter sido capaz de reduzir a liberação de todas as citocinas inflamatórias dosadas em ambos os grupos de pacientes, na dose menor (1×10^{-6} M), esse corticoide foi menos eficiente em reduzir a produção da maioria dessas citocinas produzida pelas células T de pacientes com fadiga (Figura 7). Vale ressaltar a clara resistência das células T de pacientes com fadiga em reduzir a produção de IFN- γ e IL-22 nas culturas de células dos pacientes fatigados mantidos na menor dose de HC. Em contraste, a adição das duas doses de HC foi capaz de elevar a produção de IL-10 pelas células T de pacientes com fadiga ou não.

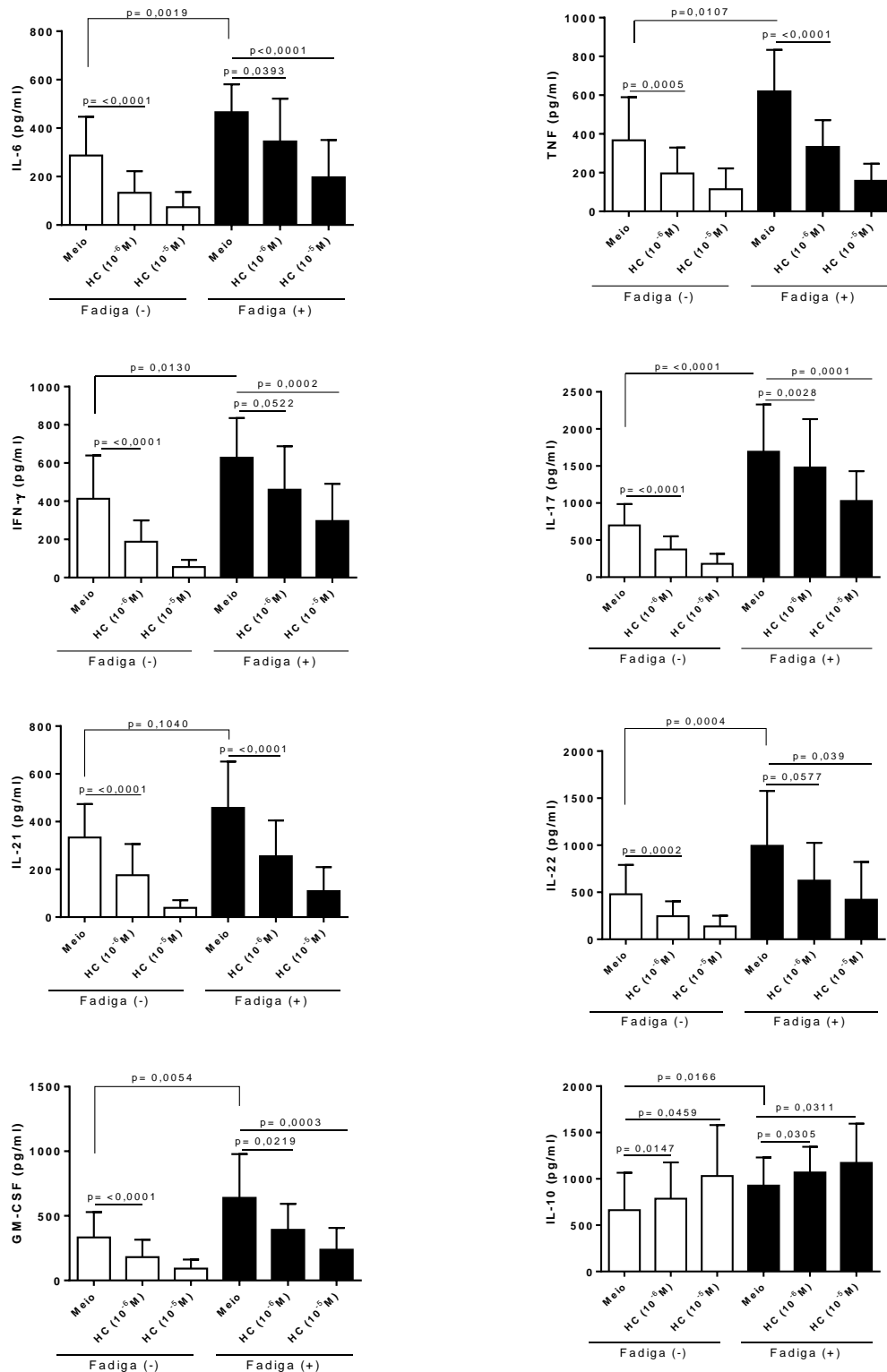


Figura 7. Ocorrência de fadiga no perfil de citocina produzido pelas células T de pacientes com EM-RR e sua sensibilidade ao corticoide. Sobrenadantes de culturas de células (1 x 10⁶/mL), contendo linfócitos T ativados com PHA (1 µg/mL), foram colhidos após 3 dias e submetidos a quantificação de citocinas pela técnica ELISA. O efeito do corticoide sobre a produção de citocina foi avaliado através da adição de hidrocortisona (HC) em duas doses diferentes (1 x 10⁻⁶ M e 1 x 10⁻⁵ M)

no início do tempo de cultura. Os pacientes foram separados em dois grupos, fatigados (FSS ≥ 28 , n=15) e não fatigados (FSS < 28, n=15).

4.4 Monócitos de pacientes com EM-RR e fadiga produzem maiores níveis de citocinas relacionadas à indução do fenótipo Th17

Durante a resposta imune, o tipo de fenótipo de células T é principalmente determinado pelo terceiro sinal liberado pelas APCs. Nesse sentido, nosso próximo objetivo foi investigar se a ocorrência de fadiga nos pacientes com EM-RR poderia também alterar a produção de citocinas liberado pelos monócitos seguindo uma rápida estimulação com LPS de *E. coli*. Como demonstrado na figura 8, monócitos de pacientes fatigados produzem níveis significativamente superiores de citocinas envolvidas na indução da diferenciação das células T no fenótipo Th17, a IL-6, IL-23 e IL-1 β mas não de IL-12 ou IL-10, citocinas envolvidas na indução dos fenótipo Th1 e Tregs. Aplicando a equação de Altman (1991), nós observamos que pacientes com níveis de IL-6 superiores a 664,5 pg/mL tinham um RR de 2,31 maior de surto durante o tempo de observação (2 anos).

Com relação a capacidade da HC em reduzir os níveis de citocinas, nós observamos uma menor eficiência desse corticoide, na menor concentração usada (1×10^{-6} M), em controlar a produção de IL-6, IL-12 e IL-23 pelos monócitos dos pacientes fatigados (Figura 8). Nenhuma diferença significativa foi observada na produção da IL-10 em ambos os grupos. Ademais, a HC não alterou a liberação dessa citocina (Figura 8).

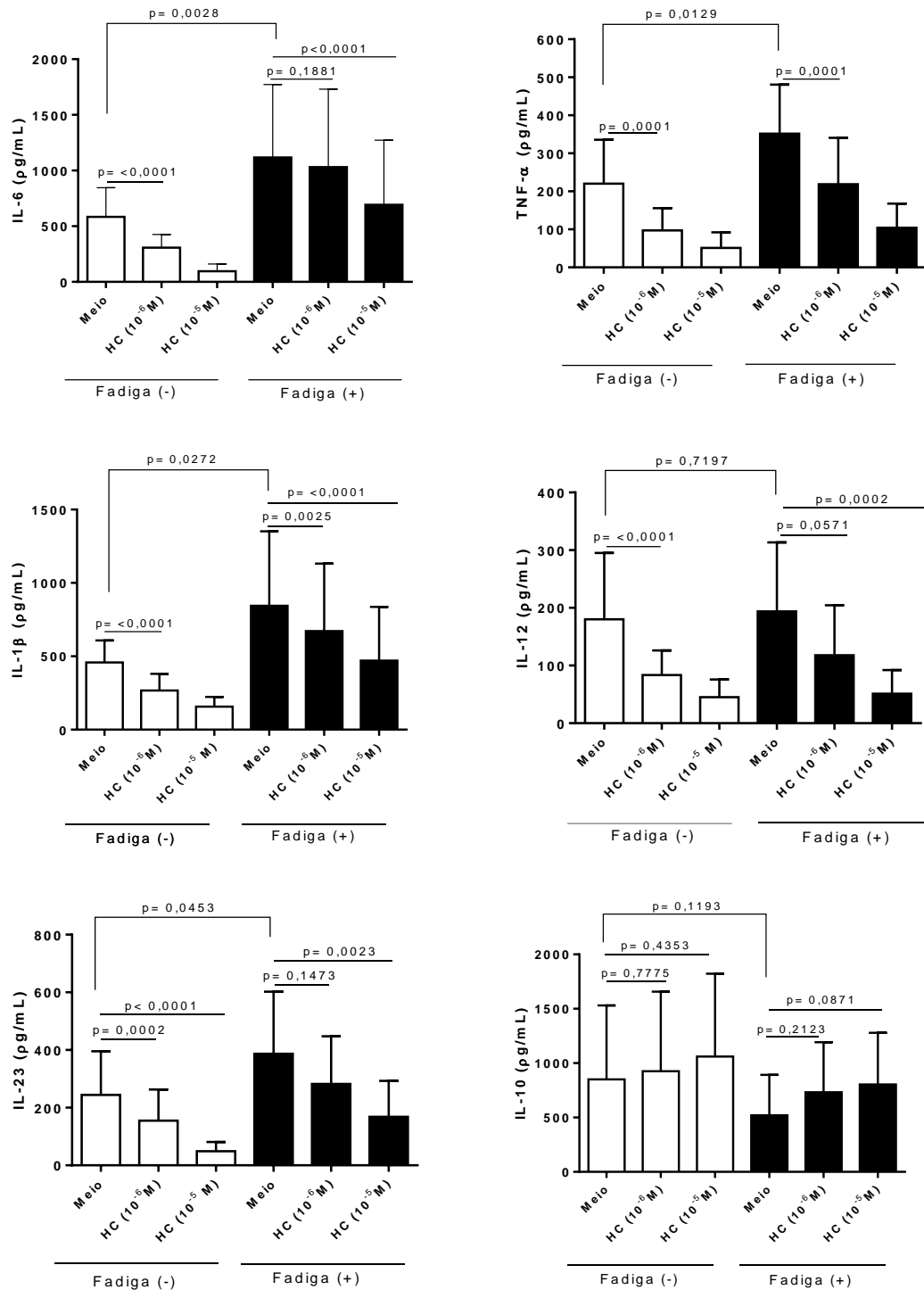


Figura 8. Ocorrência de fadiga e a produção de citocinas por monócitos de pacientes com EM-RR e sua sensibilidade ao corticoide. Sobrenadantes de culturas de monócitos (1 a $2 \times 10^5/\text{mL}$) foram colhidas após 24 h de estimulação com LPS (100 ng/mL) e submetidos a quantificação de citocinas pela técnica ELISA. O efeito do corticoide sobre a produção de citocina pelos monócitos foi avaliado através da adição de hidrocortisona (HC) em duas doses diferentes ($1 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $1 \times 10^{-5} \text{ M}$) no início do tempo de cultura. Os pacientes foram separados em dois grupos, fatigados ($\text{FSS} \geq 28$, $n=15$) e não fatigados ($\text{FSS} < 28$, $n=15$).

4.5 Correlação entre severidade de fadiga e a produção de citocinas pelas células T e monócitos de pacientes com EM-RR

Resultados anteriores mostraram uma correlação positiva entre os níveis de TNF- α e IL-6 no plasma e a gravidade de fadiga nos pacientes com EM-RR. Nas figuras 09 e 10, semelhantes correlações foram observadas entre fadiga e produção de determinadas citocinas inflamatórias pelas células T (Figura 09) e monócitos (Figura 10) ativados.

Quanto às citocinas produzidas pelas células T, fortes correlações positivas foram observadas entre a liberação de IL-6 e IL-17 e a severidade da fadiga (Figura 9). Nenhuma correlação foi observada entre a produção de IFN- γ , IL-21 e IL-10 com a pontuação FSS. Nas culturas de monócitos, correlações diretas, e igualmente fortes, foram observadas entre a pontuação FSS e a produção de IL-6, IL-1 β e IL-23 (Figura 10). Nas culturas de células contendo linfócitos T ativados, assim como nos monócitos ativados pelo LPS, nenhuma correlação foi observada entre a liberação de IL-10 e a severidade da fadiga.

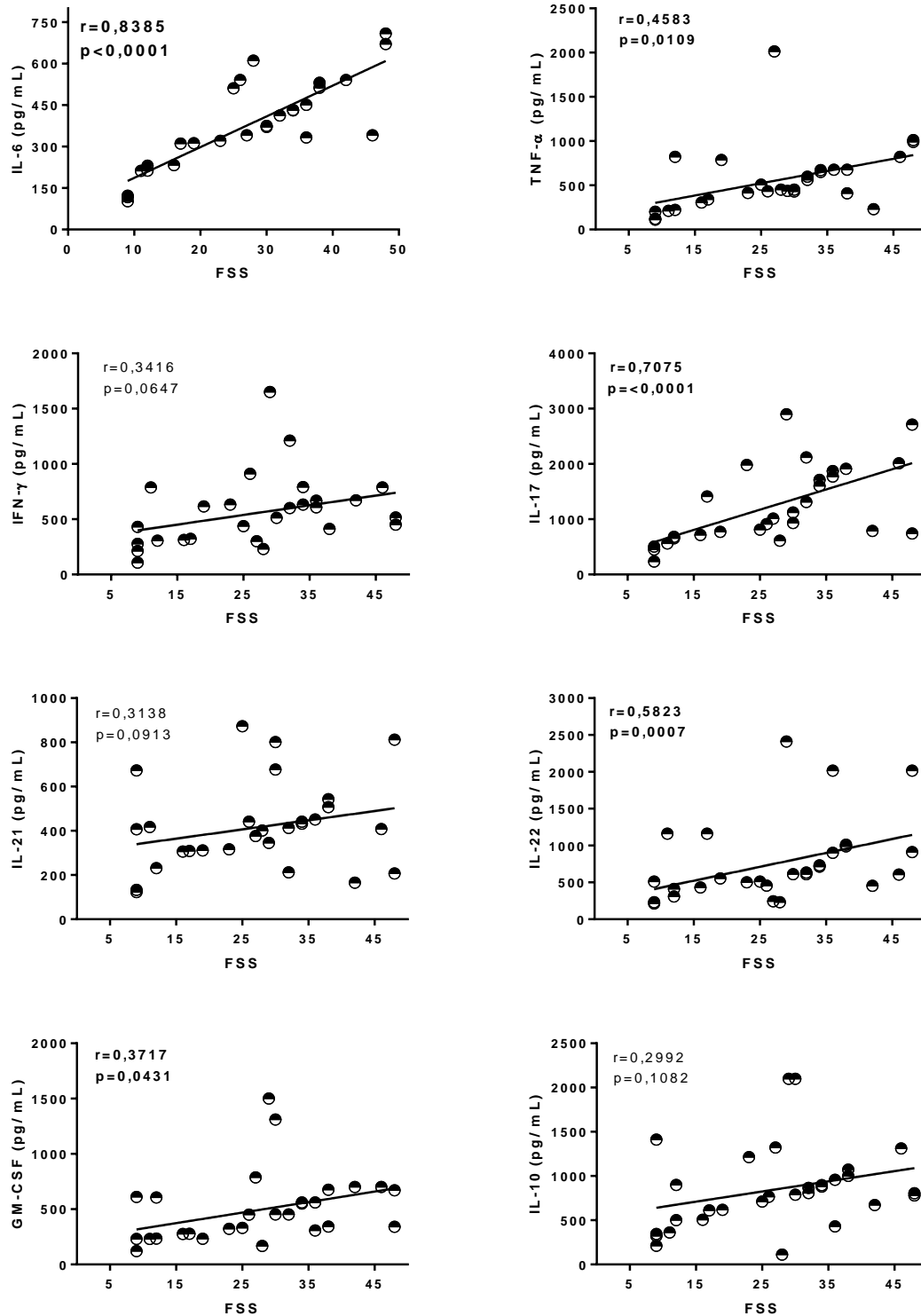


Figura 9. Correlação entre fadiga e o perfil de citocina produzido pelas células T de pacientes com EM-RR. A presença e gravidade de fadiga ($FSS \geq 28$) foi correlacionada com os níveis de citocinas detectadas nos sobrenadantes de culturas de células ($1 \times 10^6/mL$) contendo linfócitos T ativados com PHA ($1 \mu g/mL$) de pacientes com EM-RR ($n=30$) através da técnica ELISA.

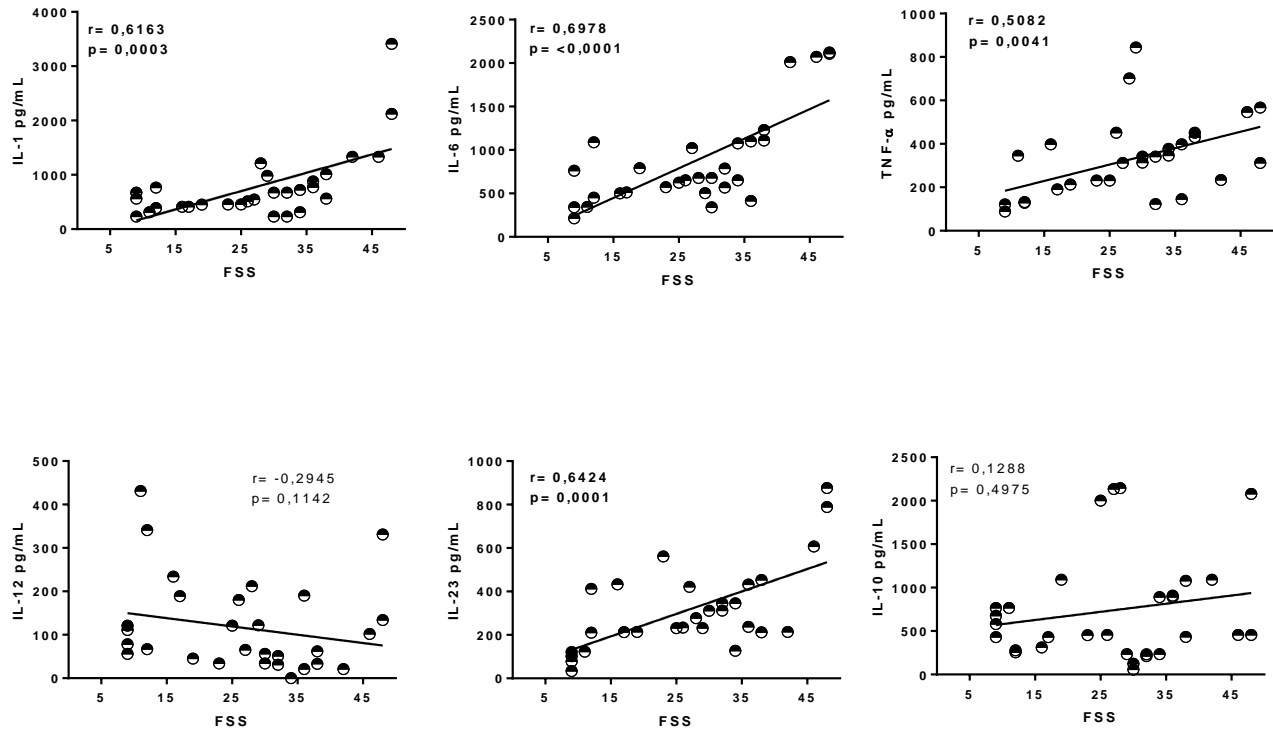


Figura 10. Correlação entre fadiga e perfil de citocina produzido por monócitos de pacientes com EM-RR. A presença e gravidade de fadiga ($FSS \geq 28$) foi correlacionada com os níveis de citocinas dosadas nos sobrenadantes de culturas de monócitos (1 a $2 \times 10^5/mL$) ativados com LPS (100 ng/mL) de pacientes com EM-RR ($n=30$) através da técnica ELISA.

5. DISCUSSÃO

Fadiga é uma das mais frequentes manifestações clínicas da EM e tem sido descrita por muitos pacientes como sendo mais incapacitante que a própria limitação física imposta por déficits motores relacionados à destruição da bainha de mielina no SNC. Tanto a EM quanto a fadiga têm sido relacionadas à produção de citocinas inflamatórias (Malekzadeh *et al.*, 2015; Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011; Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Kebir *et al.*, 2009; Bjartmar, Wwjek & Trapp, 2003; Lock *et al.*, 2002; Matusевичius *et al.*, 1999). Dados apresentados aqui, apesar de preliminares, está relacionada que a ocorrência de fadiga está relacionada a expansão do fenótipo de células T implicado na EM com repercussão clínica, identificado no presente estudo pela maior ocorrência de novas recaídas clínicas em um período de 2 anos de observação.

Para o nosso estudo o perfil de citocina *in vivo* e *in vitro* foi analisado em um grupo de pacientes com EM com ou sem fadiga, determinada pela escala de severidade de fadiga, ou FSS. Para evitar a interferência de algumas variáveis conhecidas em modular a produção de citocina, todos os indivíduos recrutados estavam na fase de remissão clínica e livres de substâncias imunomoduladoras, tal como corticoides.

A EM tem sido relacionada a expansão de células Th17. Elevada expressão da citocina IL-17 tem sido detectada nos linfócitos T do sangue periférico e das lesões cerebrais ativas dos pacientes (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Lock *et al.*, 2002; Matusевичius *et al.*, 1999). Mesmo na fase de remissão clínica, alguns estudos têm demonstrado uma maior produção de citocinas inflamatórias relacionadas ao fenótipo Th17 nos pacientes com EM quando comparado a indivíduos saudáveis (Teixeira *et al.*, 2013; Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011). Em nosso estudo, a produção das citocinas relacionadas a esse fenótipo foi significativamente superior nas culturas de células contendo linfócitos T ativadas de pacientes com fadiga. De forma interessante, a produção de TNF- α , GM-CSF e, principalmente, de IL-22, IL-6 e IL-17 pelas células T ativadas foi diretamente relacionada à severidade da fadiga. Dentre as citocinas dosados *in vivo*, os níveis de IL-6 e TNF- α não apenas foram significativamente

maiores no sangue dos pacientes com fadiga como também foram positivamente relacionadas a pontuação FSS. Coletivamente esses dados sugerem que a ocorrência de fadiga está relacionada ao aumento do estado inflamatório nos pacientes com EM mesmo estando na fase de remissão clínica.

Na EM, o $\text{INF-}\gamma$ tem sido relacionado com atividade da doença (Lovett-Racke, Yang, Racke, 2011), e no presente estudo a produção dessa citocina foi maior nos pacientes com fadiga. Entretanto, apesar da IL-12, citocina liberada pelas DCs durante a indução da diferenciação das células T CD4^+ no fenótipo Th1 (Zhu, Yamane & Paul, 2010), ter sido implicada na EM (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Skurkovich et al., 2001), a produção dessa citocina por monócitos ativados não foi significativamente diferente entre pacientes com fadiga ou sem fadiga. Esse resultado sugere que talvez a fadiga favoreça a expansão das células Th1 sem alterar a produção de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos. A contribuição do $\text{INF-}\gamma$ na patogênese da EM pode estar relacionada a sua capacidade de induzir a apoptose das células da neuroglia humana (Kebir *et al.*, 2009).

Algumas evidências apontam para o envolvimento de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ na e fadiga (Schubert *et al.*, 2007). De forma interessante, e de acordo com os nossos achados, Pokryszko-Dragan e colaboradores (2012) observaram uma forte relação direta entre fadiga e a produção de $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$ pelas células T CD4^+ de pacientes com EM.

Um aspecto interessante é que a contribuição das células Th1 como uma fonte única de $\text{INF-}\gamma$ na EM precisa ser reavaliada, desde que recente estudo em humanos demonstrou a presença de células Th17 patogênicas capazes de expressar $\text{INF-}\gamma$ envolvidas em doenças inflamatórias intestinais e resistência à inibição pelo corticoide (Ramesh *et al.*, 2014). Infelizmente, a técnica usada no presente estudo para detectar citocinas nos sobrenadantes de culturas de células contendo linfócitos T ativados não nos permite determinar a contribuição das células Th1 ou Th17 na produção do $\text{INF-}\gamma$ em nosso modelo. Esse dado poderá ser obtido usando a citometria de fluxo como ferramenta metodológica, o que será realizado no futuro próximo pela equipe.

Além da IL-17, células Th17 produzem IL-21 e IL-22, e no presente estudo a IL-22, mas não a IL-21, foi produzida em maior nível nas culturas de células de pacientes com fadiga e seus níveis foram fortemente correlacionados à pontuação do

FSS e o risco de surtos durante o tempo de seguimento clínico. De forma interessante, recente estudo tem demonstrado a presença de uma alta frequência de células T CD4⁺ IL-22⁺ incapazes de produzir IL-17 precedendo os surtos clínicos nos pacientes com EM (Rolla *et al.*, 2014). Assim como discutido no caso do IFN- γ , no momento nós não podemos aferir a contribuição das células Th17 e Th22 na produção de IL-22, o que o grupo pretende fazer num futuro próximo com a chegada de um citômetro de fluxo multifuncional.

Além das células T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ capazes de produzir IFN- γ (Tc-1) ou IL-17 (Tc-17) também têm sido relacionados à EM (Bjartmar, Wujek & Trapp, 2003; Zang *et al.*, 2004). Infelizmente, em nosso estudo atual não foi possível determinar a contribuição de cada subtipo de células T (CD4⁺ ou CD8⁺) no perfil de citocina identificado nas culturas de células de pacientes com EM com ou sem fadiga, visto que todas as células T foram estimuladas. Entretanto, independente da sua origem, a produção de algumas citocinas inflamatórias relacionadas ao fenótipo Th17 não apenas foi maior nos pacientes com fadiga, como também foram associadas ao risco de surto durante o seguimento clínico, especificamente a IL-6 e IL-22.

Trabalhos mais recentes também têm demonstrado uma elevada frequência de células T GM-CSF⁺ tanto no sangue periférico quanto nas lesões cerebrais de pacientes com EM (Behi *et al.*, 2011; Codarri *et al.*, 2011; Cravens, *et al.*, 2011). No presente estudo a produção desse fator de crescimento hematopoiético pelas células T ativadas foi maior nas culturas de células de pacientes com EM e fadiga. Adicionalmente, uma correlação positiva foi observada entre os níveis do GM-CSF e a pontuação do FSS. Portanto, desde que o GM-CSF aumenta a gravidade das lesões neuronais por aumentar a infiltração de monócitos no SNC, o incremento na produção dessa citocina pode ajudar a explicar porque os pacientes de nosso estudo com fadiga apresentaram uma forma mais ativa da doença, determinada aqui pela ocorrência de novos surtos ao longo de 2 anos de observação ambulatorial.

Classicamente, a diferenciação das células T em diferentes fenótipos é determinada principalmente pela produção de determinadas citocinas pelas células apresentadoras de antígenos (APC), como monócitos, durante a sinapse imunológica com esses linfócitos. Enquanto a produção de IL-23, IL-1 β e IL-6 favorecem a diferenciação as células T em Th17/Tc-17 (Matsuzaki & Umemura, 2007), a IL-12 está

envolvida na indução do fenótipo Th1 (Zhu, Yamane & Paul, 2010). Em nosso presente estudo, os níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-23 liberados por monócitos estimulados com LPS não apenas foram superiores nos pacientes com fadiga como foram positivamente relacionados ao FSS. Adicionalmente, o risco de novos surtos durante o segmento clínico foi associado aos níveis de IL-6 liberados por esses monócitos. Complementando, no presente estudo, os níveis periféricos de IL-6 não apenas foram maiores nos pacientes com EM e fadiga, como também foram associados à escala FSS e risco de novos surtos durante o seguimento clínico.

A fadiga é uma queixa muito comum em outros pacientes que sofrem de doenças autoimunes, tal como lúpus e artrite reumatoide (AR) (Nikolaus et al., 2013; Palagini *et al.*, 2008). Estudo de associação tem revelado uma relação estreita entre a IL-6 e a ocorrência de fadiga em pacientes com AR (Rohleder, Aringer & Boentert, 2012). Ademais, nos pacientes com AR, a fadiga também foi associada com os níveis de IL-6 produzidos pelos monócitos estimulados com LPS e com maior resistência a inibição pelo glicocorticoide (Davis et al., 2008). No contexto da EM, elevada produção não apenas de IL-6 como de IL-1 β e IL-23 pelas APC tem sido relacionada à indução de células T encefalitogênicas no modelo experimental de EM, conhecido como encefalomielite autoimune experimental (Reich et al., 2014). Como mencionado anteriormente, a expressão de GM-CSF fornece um caráter mais pró-inflamatório às células T que migram para o SNC, e as citocinas IL-23 e IL-1 β são fundamentais na indução dessas células (Behi *et al.*, 2011). Portanto, a habilidade da IL-6, IL-1 β e IL-23 em elevar a produção de GM-CSF pelas células T dos pacientes com fadiga deve ser outro mecanismo pelo qual esse evento adverso pode ser um fator de risco para progressão da EM.

Apesar da IL-12 ser outra citocina implicada nas fases ativas da EM (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Skurkovich *et al.*, 2001), em nosso estudo, a ocorrência de fadiga não alterou, de forma significativa, sua produção por monócitos de pacientes com EM. Existe a possibilidade, no entanto, que durante os surtos a produção dessa citocina seja maior nos pacientes com fadiga.

Como descrito na introdução dessa dissertação, apesar de existirem vários fatores de riscos genéticos e ambientais, o estabelecimento e prognóstico de doenças autoimunes dependem de defeitos funcionais nas células T reguladoras envolvidas na

autotolerância (Gagliani *et al.*, 2013; Vignali *et al.*, 2008; Tai *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006; Shevach *et al.*, 2006; Aluvihare *et al.*, 2004). Os mecanismos utilizados por essas células para regular negativamente respostas inflamatórias mediadas pelas células Th1 e Th17 são múltiplos, mas envolve particularmente a produção de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10 e TGF- β (Gagliani *et al.*, 2013; Tai *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, a produção de IL-10 pelas células T de pacientes com fadiga foi maior que do grupo sem fadiga, podendo significar uma tentativa de reduzir o nível de citocinas inflamatórias produzidas por esses linfócitos na ocorrência de fadiga. Por outro lado, nenhuma diferença significativa quanto aos níveis dessa citocina foi detectada nos sobrenadantes dos monócitos de ambos grupos de pacientes. No contexto da EM, a maioria dos achados sugere que apesar das células T reguladoras circulantes serem funcionalmente preservadas, estas não conseguem suplantar o elevado status ativado no qual o paciente é condicionado durante os surtos (Michel *et al.*, 2008). Vale a pena ressaltar, no entanto, que existe a possibilidade de que os achados no sangue periférico não reflitam os acontecimentos no local de lesão, isto é, dentro do SNC. Estudo por Venken e colaboradores (2007) demonstrou, por exemplo, que os linfócitos T reguladores representam o infiltrado celular minoritário nas lesões cerebrais dos pacientes que vieram a óbito com EM. Apesar de nosso estudo ser preliminar e ter sido conduzido na fase de remissão clínica, deficiência na produção de IL-10 não parece ser o evento primário ligado a elevada produção de citocinas inflamatórias nos pacientes com fadiga.

Na síndrome de fadiga crônica, uma desordem neurológica com envolvimento imune de etiologia desconhecida, a elevada produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , não foi associada a um comprometimento na frequência de células T reguladoras nem na produção de IL-10, que na verdade apresentaram-se elevadas (Curriu *et al.*, 2013; Brenu *et al.*, 2011).

Durante os surtos, os pacientes com EM são tratados com elevadas doses de corticoides, potentes drogas imunossupressoras. Entretanto, a medida que a doença progride a maioria dos pacientes desenvolve resistências a esses esteroides (Fischer *et al.*, 2012; Gold *et al.*, 2012). Em nosso estudo, apesar da maior dose de hidrocortisona (HC) ter sido capaz de reduzir a produção das citocinas inflamatórias

em ambos os grupos, na menor dose usada, uma clara resistência a esse corticoide foi observada quanto a produção de IL-22 e IFN- γ pelas células T ativadas dos pacientes com fadiga. A menor dose da HC foi igualmente menos eficiente em regular negativamente a produção de IL-6, IL-12 e IL-23 por monócitos de pacientes com fadiga. Esses resultados sugerem que a fadiga possa facilitar o desenvolvimento de resistência aos corticoides, reduzindo as possibilidades terapêuticas no resgate dos pacientes com EM em surto. Essa hipótese precisa, no entanto, ser testada em um número maior de pacientes.

Infelizmente não existe ainda um tratamento eficaz para fadiga. Atualmente as drogas disponíveis, tal como a amantadina, têm trazidos benefícios limitados aos pacientes com EM. Entretanto, atualmente a prática de exercícios físicos regulares de intensidade moderada tem sido creditada como um poderoso adjuvante no manejo clínico da fadiga. A prática de exercícios regulares, além de aumentar a força muscular, pode trazer outros benefícios à saúde mental, tal como controle dos transtornos de humor, particularmente a depressão, tão prevalente nos pacientes com EM (Navipour *et al.*, 2006; Rietberg *et al.*, 2005; Oken *et al.*, 2004). Nesse sentido, estudo recente publicado pelo nosso grupo (Alvarenga-Filho *et al.*, 2016) demonstrou que a prática de atividades física em um número pequeno de pacientes com EM com baixo valor de EDSS (> 2) não apenas reduziu a fadiga como também os níveis de citocinas inflamatórias, particularmente IL-22, associado ao aumento da liberação de IL-10 pelas células T ativadas.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A ocorrência de fadiga, determinada pela escala FSS, está relacionada não apenas ao aumento da produção de citocinas relacionadas aos fenótipos Th17 e Th1 em pacientes com esclerose múltipla (EM), como também aos níveis de IL-22, IL-6, TNF- α , GM-CSF e IL-17 foram associados a pontuação do FSS.
- ✓ Dentro do compartimento das células T do tipo Th17, a fadiga está correlacionada a produção de IL-22, IL-6, IL-17 e GM-CSF tanto diretamente, como também indiretamente, por amplificar a produção de IL-1 β , IL-6 e IL-23 por monócitos de pacientes com EM.
- ✓ Fadiga, muito provavelmente por aumentar a produção de citocinas inflamatórias tais como IL-6 e IL-22, está relacionada ao risco de novos surtos agudos durante o seguimento clínico (2 anos).
- ✓ Os níveis periféricos de IL-10 não foram significativamente diferentes entre os pacientes com EM com ou sem fadiga. Ademais, a produção dessa citocina foi maior nas culturas de células T dos pacientes com fadiga, sugerindo que elevada produção de citocinas inflamatórias documentada nesses últimos pacientes não foi devido à falha primária na produção de citocina anti-inflamatória.
- ✓ Menor sensibilidade das células T e monócitos a hidrocortisona foi observada nos pacientes com fadiga em nosso estudo, sugerindo que, talvez, a ocorrência de fadiga aumente o risco de falha terapêutica com corticoide durante os surtos de incapacidade neurológica.
- ✓ No geral, nossos dados, apesar de preliminares, sugerem que a ocorrência de fadiga está relacionada negativamente com o curso da EM. Essa relação adversa deve estar relacionada à produção elevada de citocinas inflamatórias relacionadas aos fenótipos Th1 e, principalmente, Th17.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams R.D., Victor M., (1989). Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases, *Principles of Neurology*, 4, 755–774.
- Agarwal, S.K., Marshall Jr., G.D. (1998). Glucocorticoid-induced type 1/type 2 cytokine alterations in humans: a model for stress-related immune dysfunction. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 1059–1068.
- Altman DG (1991). *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall,
- Aluvihare, V. R.; Kallikourdis, M.; Betz, A. G. (2004). Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.*, 5: 266-271.
- Alvarenga-Filho H, Sacramento PM, Ferreira TB, Hygino J, Abreu JE, Carvalho SR, Wing AC, Alvarenga RM, Bento CA (2016). Combined exercise training reduces fatigue and modulates the cytokine profile of T-cells from multiple sclerosis patients in response to neuromediators. *J Neuroimmunol.* 293:91-9.
- Alvarenga-Filho, H., Carvalho, S. R. da S., Dias, R. M., Alvarenga, R. M. P. (2010). Principais testes utilizados na avaliação de fadiga na esclerose múltipla: revisão sistemática. *Rev. Bras. Neurol*, 46(2).
- Alves Galvão, MG; Rocha Crispino Santos, MA; Alves da Cunha, AJ (2014). Amantadine and rimantadine for influenza A in children and the elderly. *Cochrane Database Syst Rev.* 21;(11):CD002745.
- Asano M, Berg E, Johnson K, Turpin M, Finlayson ML.(2015) A scoping review of rehabilitation interventions that reduce fatigue among adults with multiple sclerosis. *Disabil Rehabil.* 37(9):729-38.
- Behi, M.; Ciric, B.; Dai, H.; Yan, Y.; Cullimore, M.; Safavi, F.; Zhang, G.X.; Dittel, B.N.; Rostami, A.(2011) The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology*, 12: 568-75, 2011.
- Bergamaschi, R., Romani, A., Versino, M., Poli, R., & Cosi, V. (1997). Clinical aspects of fatigue in multiple sclerosis. *Functional Neurology*, 12(5), 247–251.

- Bjartmar, C., Wujek, J., Trapp, B. (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 206(2): 165–171.
- Braley, T. J., Chervin, R. D. (2010). Fatigue in Multiple Sclerosis: Mechanisms, Evaluation, and Treatment. *Sleep*, 33(8): 1061–1067.
- Brañas, P., Jordon, R., Fry-Smith, A., Burls, A., Hyde, C. (2000). Treatments for fatigue in multiple sclerosis: a rapid and systematic review. *Health Technology Assessment*, 4(27): 61.
- Breitbart, W. (2001). A Randomized, Double-blind, Placebo-Controlled Trial of Psychostimulants for the Treatment of Fatigue in Ambulatory Patients With Human Immunodeficiency Virus Disease. *Archives of Internal Medicine*, 161(3): 411.
- Brenu EW, van Driel ML, Staines DR, Ashton KJ, Ramos SB, Keane J, Klimas NG, Marshall-Gradisnik SM. (2011). Immunological abnormalities as potential biomarkers in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis. *J Transl Med*. 28: 9:81.
- Broux B, Mizee MR, Vanheusden M, van der Pol S, van Horssen J, Van Wijmeersch B, Somers V, de Vries HE, Stinissen P, Hellings N.(2015). IL-15 amplifies the pathogenic properties of CD4+CD28- T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*. 194(5): 2099-109.
- Brucklacher-Waldert V, Stürner K, Kolster M, et al.(2009) Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*. 132:3329–3341.
- Ceccarelli F, Agmon-Levin N, Perricone C (2016). Genetic factors of autoimmune diseases. *Journal of Immunology Research*, 2016, ID 3476023.
- Codarri, L.; Gyulveszi, G.; Tosevski, V.; Hesske, L.; Fontana, A.; Magnenat, L.; Suter, T.; Becher, B.(2011) Ror-gamma t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*.12: 560-567.
- Confavreux, C., Compston, A.(2006) The natural history of multiple sclerosis. In: COMPSTON A (Org). *McAlpine's Multiple Sclerosis*. USA: Elsevier. P183-284.

- Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., Adeleine, P. (2000). Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 343(20), 1430–1438.
- CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S (2006). Natural History of multiple sclerosis:a unifying concept. *Brain*, 129: 606-616.
- Costantino, C. M., Hutton, J., Baecher-Allan, C., Hafler, D. A. (2008a). Multiple Sclerosis and Regulatory T Cells. *Journal of Clinical Immunology*, 28(6): 697–706.
- Costantino, C. M.; Baecher-Allan, C. M.; Hafler, D. A. (2008b) Human regulatory T cells and autoimmunity. *Eur. J. Immunol.*, 38: 921-924.
- Cravens, P.D.; Hussain, R.Z.; Zacharias, T.E.; Ben, L.H.; Herndon, E.; Vinnakota, R.; Lambracht-Washington, D.; Nessler, S.; Zamvil, S.S.; Eagar, T.N.; Stuve, O. (2011) Lymph node-derived donor encephalitogenic CD4+ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. *J Neuroinflammation*. 8: 73.
- Crozat K, Vivier E, Dalod M. (2009). Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunol. Rev.* 227: 129–149.
- Curriu M, Carrillo J, Massanella M, Rigau J, Alegre J, Puig J, Garcia-Quintana AM, Castro-Marrero J, Negredo E, Clotet B, Cabrera C, Blanco J. (2013). Screening NK, B- and T-cell phenotype and function in patients suffering from Chronic Fatigue Syndrome. *J Transl Med.* 11:68.
- da Gama Pereira, A. B. C. N., Sampaio Lacativa, M. C., da Costa Pereira, F. F. C., Papais Alvarenga, R. M. (2015). Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 4(6): 572–579.
- Damasceno, A., Damasceno, B. P., Cendes, F. (2015). Atrophy of reward-related striatal structures in fatigued MS patients is independent of physical disability. *Multiple Sclerosis Journal* 22(6):822-9.
- Davis MC, Zautra AJ, Younger J, Motivala SJ, Attrep J, Irwin MR.(2008) Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue. *Brain Behav Immun.* 22(1):24-32.

- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(11): 1303–1310.
- Dustin ML, Tseng S-Y, Varma R, Campi G. (2006) T-cell-dendritic cell immunological synapses. *Cur Opin Immunol* , 18: 512-16.
- Elliott, C.; Lindner, M.; Arthur, A.; Brennan, K.; Jarius, S.; Hussey, J.; Chan, A.; Stroet, A.; Olsson, T.; Willison, H.; Barnett, S.C.; et al. (2012). Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain*, 135: 1819-33.
- Esiri, M. M. (1977) Immunoglobulin-containing cells in multiple-sclerosis plaques. *Lancet*, 2: 478.
- Falcon, S. (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol*, 9: 407.
- Fallarino, F.; Grohmann, U.; Hwang, K.W.; Orabona, C.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Belladonna, M. L.; Fioretti, M. C.; Alegre, M. L.; Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.*, 4: 1206–12.
- Fantini, M. C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P. R.; Neurath M. F. (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immuno.*, 172: 5149–5153.
- Fischer, A., Otte, C., Krieger, T., Nicholls, R.A., Kruger, S.A., Ziegler, K.J., Schulz, K.-H., Heesen, C., Gold, S.M., (2012). Decreased hydrocortisone sensitivity of T cell function in multiple sclerosis-associated major depression. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1712–1718.
- Fisk, J. D., Pontefract, A., Ritvo, P. G., Archibald, C. J., Murray, T. J. (1994). The impact of fatigue on patients with multiple sclerosis. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 21(1): 9-14.
- Flachenecker, P., Bihler, I., Weber, F., Gottschalk, M., Toyka, K. V, Rieckmann, P. (2004). Cytokine mRNA expression in patients with multiple sclerosis and fatigue. *Multiple Sclerosis*, 10 (2): 165–169.

- Freal, J. E., Kraft, G. H., Coryell, J. K. (1984). Symptomatic fatigue in multiple sclerosis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 65(3): 135–138.
- Gagliani, N.; Magnani, C.F.; Huber, S.; Gianolini, M.E.; Pala, M.; Licona-Limon, P.; Guo, B.; Herbert, D.R.; Bulfone, A.; Trentini, F.; Di Serio, C.; Bacchetta, R.; Andreani, M.; Brockmann, L.; Gregori, S.; Flavell, R.A.; Roncarolo, M.C. (2013) Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.*, 19(6):739-46.
- Genain, C.P.; Cannella, B.; Hauser, S.L.; Raine, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*, 5: 170-75.
- Genova, H. M., Rajagopalan, V., Deluca, J., Das, A., Binder, A., Arjunan, A., Wylie, G. (2013). Examination of cognitive fatigue in multiple sclerosis using functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *PLoS One*, 8(11): e78811.
- Gold, S.M., Sasidhar, M.V., Lagishetty, V., Spence, R.D., Umeda, E., Ziehn, M.O., Krieger, T., Schulz, K.H., Heesen, C., Hewison, M., Voskuhl, R.R. (2012). Dynamic development of glucocorticoid resistance during autoimmune neuroinflammation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (8): E1402-E14010.
- Grohmann, U.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Calcinaro, F.; Falorni, A.; Candeloro, P.; Belladonna, M. L.; Bianchi, R.; Fioretti, M. C.; Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.*, 3: 1097-1101.
- Henrickson S.E., von Adrian U.H. (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur Opin Immunol*, 19: 249-58.
- Iriarte, J., Katsamakidis, G., De Castro, P. (1999). The fatigue descriptive scale (FDS): a useful tool to evaluate fatigue in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 5 (1): 10–16.
- Jia L., Wu C. (2014). The biology and functions of Th22 cells. *Adv Exp Med Biol.*, 841:209-30.
- Kanbayashi, T., Sagawa, Y., Takemura, F., Ito, S.-U., Tsutsui, K., Hishikawa, Y., Nishino, S. (2011). The Pathophysiologic Basis of Secondary Narcolepsy and Hypersomnia. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 11(2): 235–241.

- Kebir H., Ifergan I., Alvarez J. I., Bernard M., Poirier J., Arbour N., Duquette P., Prat A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 66: 390–402.
- Kos, D., Kerckhofs, E., Nagels, G., D'hooghe, M. B., Ilsbrouckx, S. (2008). Origin of Fatigue in Multiple Sclerosis: Review of the Literature. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, 22(1): 91–100.
- Kroencke, D. C., Lynch, S. G., & Denney, D. R. (2000). Fatigue in multiple sclerosis: relationship to depression, disability, and disease pattern. *Multiple Sclerosis* , 6 (2), 131– 136.
- Krupp L.B, Alvarez, LA ,La Rocca NG., Scheinberg LC, S. (1988). FAatigue in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 45(4): 435–437.
- Krupp L.B., La Rocca NG, Muir-Nashj, Steinberg AD. (1989). The fatigue severity scale: Application to patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Archives of Neurology*, 46(10): 1121–1123.
- Krupp, L. (2003). Fatigue in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 17(4) 225–234.
- Kurtzke, J. Clinical manifestations of multiple sclerosis. In: Vinken, P.J, Bruyn, G.W. (1970) (Eds), *Handbook of Clinical Neurology: Multiple sclerosis and other demyelinating diseases*. Amsterdam: North Holland.
- Kurtzke, J. F. (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444–1452.
- Lee, C.-C., Lin, S.-J., Cheng, P.-J., Kuo, M.-L. (2009) The regulatory function of umbilical cord blood CD4 + CD25 + T cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 and exogenous interleukin (IL)-2 or IL-15. *Pediatric Allergy and Immunology*, 20(7), 624–632.
- Levings, M. K.; Sangregorio, R.; Sartirana, C. (2002) Human CD25+CD4+ T suppressor cell clones produce transforming growth factor beta, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J Exp Med.*, 196: 1335–46.
- Liu, W.; Putnam, A. L.; Xu-Yu, Z.; Szot, G. L.; Lee, M. R.; Zhu, S.; Gottlieb, P. A.; Kapranov, P.; Gingeras, T. R.; Fazekas De St Groth, B.; Clayberger, C.; Soper, D.

- M.; Ziegler, S. F.; Bluestone, J. A.(2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med.*, 203: 1701-1711.
- Lock, C.; Hermans, G.; Pedotti, R.; Brendolan, A.; Schadt, E.; Garren, H.; Langer-Gould, A.; Strober, S.; Cannella, B.; Allard, J.; Klonowski, P.; Austin, A.; Lad, N.; Kaminski, N.; Galli, S. J.; Oksenberg, J. R.; Raine, C. S.; Heller, R.; Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Med.*, 8: 500–508.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. (2011) Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Bioch Bioph Acta.* 2011; 1812:246–251.
- Lublin, F. D. (2014). New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *European Neurology*, 72(suppl 1(Suppl. 1), 1–5.
- Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. *Ann. Neurol.*, 47: 707–717.
- Ma, A.; Xiong, Z.; Hu, Y.; Qi, S.; Song, L.; Dun, H.; Zhang, L.; Lou, D.; Yang, P.; Zhao, Z.; Wang, X.; Zhang, D.; Daloz, P.; Chen, H. (2009). Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. *Intern Immunopharmacol*, 9: 599-608.
- Mahnke, K.; Enk, A. H. (2005) Dendritic cells: key cells for the induction of regulatory T cells? *Curr Top Microbiol Immunol.*, 293: 133–150.
- Malekzadeh, A., Geer-peeters, W. Van De, Groot, V. De, Teunissen, C. E., Beckerman, H., Group, T. S. (2015). Fatigue in Patients with Multiple Sclerosis : Is It Related to Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines ?, 2015.
- Matsuzaki G, Umemura M. (2007). IL-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol. Immunonol*, 51:1139-1147.
- Mattson, D. H.; Roos, R. P.; Arnason, B. G. (1980) Isoelectric focusing of IgG eluted from multiple sclerosis and subacute sclerosing panencephalitis brains. *Nature*, 287: 335–37.

- Matusevicius, D.; Kivisäkk, P.; He, B.; Kostulas, N.; Ozenci, V.; Fredrikson, S.; Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 5:101-104.
- Mckinstry, K.K.; Strut, T.M.; Swain, S.L. (2010). The potential of CD4 T-cell memory. *Immunol* 130: 1-9.
- Mendes, M. F., Tilbery, H. P., Balsimell, S., Felipe, E., Moreira, M. A., & Barão-Cruz, A. N. A. M. (2000). Fadiga na forma remitente recorrente da esclerose múltipla . *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 58(2b):471-5
- Michel, L.; Berthelot, L.; Pettré, S.; Wiertlewski, S.; Lefrère, F.; Braudeau, C.; Brouard, S.; Soullillou, J. P.; Laplaud, D. A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest*, 118: 3411-3419.
- Miller, D. H., Weinshenker, B. G., Filippi, M., Banwell, B. L., Cohen, J. a, Freedman, M. S., Polman, C. H. (2008). Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 14(9), 1157-1174
- Mills, R. J., Young, C. A., Pallant, J. F., Tennant, A. (2010). Development of a patient reported outcome scale for fatigue in multiple sclerosis: The Neurological Fatigue Index (NFI-MS). *Health and Quality of Life Outcomes*, 8, 22.
- Milo, R.; Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev.* 13: p. 518-24.
- Miossec P. (2009). IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microb. Infect*, 11: 625-630.
- MSIF. (2013). Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. Multiple Sclerosis International Federation.
- Nakamura, K.; Kitani, A.; Fuss, I.; Pedersen, A.; Harada, N.; Nawata, H.; Strober, W. (2004). TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.*, 172: 834–42.

- Navipour, H., Madani, H., Mohebbi, M. R., Navipour, R., Roozbayani, P., Paydar, A. (2006). Improved fatigue in individuals with multiple sclerosis after participating in a short-term self care program. *NeuroRehabilitation* 21: 37-41.
- Neille, L. K., Goodin, D. S., Goodkin, D. E., Hauser, S. L. (1996). Side effect profile of interferon beta-1b in MS: Results of an open label trial. *Neurology*, 46 (2): 552–553.
- Nikolaus S, Bode C, Taal E, van de Laar MA. (2013). Fatigue and factors related to fatigue in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 65(7):1128-46.
- Nogueira L, K., Calazans Nogueira, L. A., Resende Nóbrega, F., Alvarenga-Filho, H., & Papais Alvarenga, R. M. (2010). Limitação funcional, fadiga e qualidade de vida na forma progressiva primária da Esclerose Múltipla. *Revista Neurociencias*, 18(1), 13–17.
- Nogueira, L. A. C., Nóbrega, F. R., Lopes, K. N., Thuler, L. C. S., & Alvarenga, R. M. P. (2009). The effect of functional limitations and fatigue on the quality of life in people with multiple sclerosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*;67(3b):812-7
- Oken, B.S., Kishiyama, S., Zajdel, D., Bourdette, D., Carlsen, J., Haas, M., Hugos, C., Kraemer, D.F., Lawrence, J., Mass, M. (2004.) Randomized controlled trial of yoga and exercise in multiple sclerosis. *Neurology* 62: 2058–2064.
- Palagini L, Mosca M, Tani C, Gemignani A, Mauri M, Bombardieri S. (2013) Depression and systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Lupus*. Apr;22(5):409-16.
- Penna, G.; Adorini, L. (2000). $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D₃ inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol.*, [S.I.], v. 164, p. 2405-2411.
- Penner, I. K., Raselli, C., Stöcklin, M., Opwis, K., Kappos, L., Calabrese, P. (2009). The Fatigue Scale for Motor and Cognitive Functions (FSMC): validation of a new instrument to assess multiple sclerosis-related fatigue. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 15(12), 1509–17.
- Piccirillo, C. A., Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8⁺ T cell activation by CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. :*

1950), 167(3), 1137–1140.

- Pilutti, L.A.; Dlugonski, D.; Sandroff, B.M.; Suh, Y.; Pula, J.H.; Sosnoff, J.J.; Motl, R.W. (2013). Gait and six- minute walk performance in persons with multiple sclerosis. *Journal of neurological sciences*, [S.l.], v. 334, p. 72-76.
- Pokryszko-Dragan, A., Frydecka, I., Kosmaczewska, A., Cizak, L., Bilińska, M., Gruszka, E., Frydecka, D. (2012). Stimulated peripheral production of interferon-gamma is related to fatigue and depression in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 114(8), 1153–8.
- Polanczyk, M. J.; Hopke, C.; Vandembark, A. A.; Offner, H. (2006). Estrogen mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *J Neurosci Res*. 284: 370–378.
- Ponomarev E. D., Shriver L. P., Maresz K., Pedras-Vasconcelos J., Verthely D., Dittel B. N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 178: 39-48.
- Pucci, E., Brañas Tato, P., D’Amico, R., Giuliani, G., Solari, A., Taus, C. (2007). Amantadine for fatigue in multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Radbruch, L., Strasser, F., Elsner, F., Gonçalves, J. F., Løge, J., Kaasa, S. (EAPC), the R. S. C. of the E. A. for P. C. (2008). Fatigue in palliative care patients — an EAPC approach. *Palliative Medicine* 22 (1): 13–32.
- Ramesh R., Kozhaya L., McKevitt K., Djuretic I. M., Carlson T. J., Quintero M. A., McCauley J. L., Abreu M. T., Unutmaz D., Sundrud M. S. (2014). Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med*. 211, 89-104
- Rasouli J., Ciric B., Imitola J., Gonnella P., Hwang H., Mahajan K., Mari E. R., Safavi F., Leist T. P., Zhang G. X., Rostami A. (2015). Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. *J Immunol*. 194: 5085-93.

- Reich K. M., Fedorak R. N., Madsen K., Kroecker K. (2014). Vitamin D improves inflammatory bowel disease outcomes: basic science and clinical review. *World J Gastroenterol.* 20: 4934-47.
- Rietberg, M.B., Brooks, D., Uitdehaag, B.M., Kwakkel, G. (2005). Exercise therapy for multiple sclerosis. *Cochrane Database Sys. Rev.* CD003980.
- Rocca, M. A., Falini, A., Colombo, B., Scotti, G., Comi, G., Filippi, M. (2002). Adaptive functional changes in the cerebral cortex of patients with nondisabling multiple sclerosis correlate with the extent of brain structural damage. *Annals of Neurology*, 51(3): 330-339.
- Rohleder N, Aringer M, Boentert M. (2012) Role of interleukin-6 in stress, sleep, and fatigue. *Ann N Y Acad Sci.*1261:88-96
- Rolla S., Bardina V., De Mercanti S., Quaglino P., De Palma R., Gned D., Brusa D., Durelli L., Novelli F, Clerico M. (2014). Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- β . *J Leukoc Biol.* 96: 1155-64.
- Roncarolo, M. G.; Bacchetta, R.; Bordignon, C.; Narula, S.; Levings, M. K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 182: 68–79.
- Saito, S.; Shima, A.; Nakashima, A.; Shiozaki, A.; Ito, M.; Sasak, Y. (2007). What is the role of regulatory T cells in the success of implantation and early pregnancy? *J Assist Reprod Genet.* 24: 379–386.
- Schubert, C., Hong, S., Natarajan, L., Mills, P.J., Dimsdale, J.E. (2007). The association between fatigue and inflammatory marker levels in cancer patients: a quantitative review. *Brain Behav. Immun.* 21 (4), 413–427.
- Shevach, E. M., DiPaolo, R. a, Andersson, J., Zhao, D.-M., Stephens, G. L., Thornton, A. M. (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212: 60–73.
- Skurkovich, S.; Boiko, A.; Beliaeva, I.; Buglak, A.; Alekseeva, T.; Smirnova, N.; Kulakova, O.; Tchechonin, V.; Gurova, O.; Deomina, T.; Favorova, O. O.; Skurkovic, B.; Gusev, E.(2001). Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNFalpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 7: 277–284.

- Smolders, J.; Thewissen, M.; Peelen, E.; Menheere, P.; Tervaert, J.W.; Damoiseaux, J.; Hupperts, R. (2009) Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis.. *PLoS One*, 4 (8): e6635.
- Steens, A., de Vries, A., Hemmen, J., Heersema, T., Heerings, M., Maurits, N., & Zijdwind, I. (2012). Fatigue perceived by multiple sclerosis patients is associated with muscle fatigue. *Neurorehabil Neural Repair*, 26(1), 48–57.
- Steinbrink, K.; Jonuleit, H.; Müller, G.; Schuler, G.; Knop, J.; Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanomaantigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood*, 93: 1634-1642.
- Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat. Immunol.*, 2: 762–764.
- Strober, L. B., & Arnett, P. A. (2005). An examination of four models predicting fatigue in multiple sclerosis. *Archives of Clinical Neuropsychology : The Official Journal of the National Academy of Neuropsychologists*, 20(5), 631–46.
- Tai, P.; Wang, J.; Jin, H.; Song, X.; Yan, J.; Kang, Y.; Zhao, L.; An, X.; Du, X.; Chen, X.; Wang, S.; Xia, G.; Wang, B.(2008). Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J Cell Physiol*. 214: 456-64.
- Teixeira, B., Bittencourt, V. C. B., Ferreira, T. B., Kasahara, T. M., Barros, P. O., Alvarenga, R., Hygino, J., Andrade, Regis Mariano De, Andrade, Arnaldo Feitosa Braga De, Bento, (2013). CAM. Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17-related cytokines production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels. *Clinical Immunology (Orlando, Fla. Print)*. 48: 209- 218.
- Tombaugh, T.N.; Berrigan, L.I.; Walker, L.A.; Freedman, M.S. (2010). The computerized test of information processing (CTIP) offers an alternative to the PASSAT for assessing cognitive processing speed in individuals with multiple sclerosis. *Cog Behav Neurol.*, 23:192-198.

- Trotter, J.; DeJong, L.J.; Smith, M.E. (1986). Opsonization with antimyelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. *J Neurochem.* 47: 779-89.
- Venken, K.; Hellings, N.; Thewissen, M.; Somers, V.; Hensen, K.; Rummens, J. L.; Medaer, R.; Hupperts, R.; Stinissen, P. (2007). Compromised CD4⁺ CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunol* 123: 79–89.
- Vignali, D. A.; Collison, L. W.; Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.*,8: 523–532.
- Vojdani A. (2014). A potential link between environmental triggers and autoimmunity. *Autoimmune Diseases*, 2014; ID 437231.
- Wade, B. J. (2014). Spatial Analysis of Global Prevalence of Multiple Sclerosis Suggests Need for an Updated Prevalence Scale. *Multiple Sclerosis International*, 2014, 124578.
- Walker, M. R.; Carson, B. D., Nepom, G. T.; Ziegler, S. F.; Buckner, J. H. (2005). De novo generation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human CD4⁺CD25⁻ cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102: 4103-4108.
- Wing, K., Ekmark, A., Karlsson, H., Rudin, A., Suri-Payer, E. (2002). Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunology*, 106(2), 190-199.
- Wing, K.; Ekmark, A.; Karlsson, H.; Rudin, A.; Suri-Payer, E.(2002). Characterization of human CD25⁺ CD4⁺ T cells in thymus, cord and adult blood. *Immunol.*, 106: 190–199.
- Zang, Y.C.; Li, S.; Rivera, V.M.; Hong, J.; Robinson, R.R.; Breitbach, W.T.; Killian, J.; Zhang, J.Z. (2004). Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol.* 172: 5120-7.
- Zhu, J.; Yamane, H.; Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Ann. Rev. Immunol.*, 28: 445-489.

8. Anexo

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
GAFFREE E
GUINLE/HUGG/UNIRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PERFIL IMUNE NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Pesquisador: Cleonice Alves de Melo Bento

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43009015.6.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.044.203

Data da Relatoria: 29/04/2015

Apresentação do Projeto:

ANÁLISE DO PERFIL FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o impacto de diferentes fatores ambientais no perfil funcional das dos linfócitos de pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente (EM-RR) e sua relação com o curso da doença e resposta à terapêutica.

Objetivo Secundário:

Avaliar a expressão de diferentes tipos de receptores do tipo toll (TLRs) em células T e B de pacientes com EM-RR; Investigar o papel de diferentes agonistas de TLRs na resposta proliferativa e produção de citocinas em culturas de células T de pacientes com EM à proteína básica da mielina (PBM); Avaliar a habilidade do glicocorticoide em modular a resposta das células T e B de pacientes com EM estimuladas in vitro com PBM, na presença ou na ausência de diferentes agonsitas de TLRs; Avaliar a capacidade da vitamina D em modular o status funcional das células T e B de pacientes com EM-RR seguindo a adição de PBM com ou sem diferentes agonistas de TLRs.

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: cephugg@gmail.com