

CARLOS OTÁVIO BRANDÃO

ESCLEROSE MÚLTIPLA:

**Mediadores da resposta inflamatória associados à
ressonância magnética quantitativa**

CAMPINAS

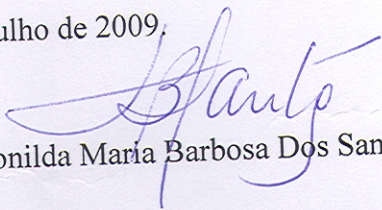
Unicamp

2009

CARLOS OTÁVIO BRANDÃO

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas Área de concentração Ciências Biomédicas do (a) aluno(a) **Carlos Otávio Brandão**

Campinas, 23 de julho de 2009.


Prof(a). Dr(a). Leonilda Maria Barbosa Dos Santos
Orientador(a)

ESCLEROSE MÚLTIPLA:

**Mediadores da resposta inflamatória associados à
ressonância magnética quantitativa**

CAMPINAS

Unicamp

2009

CARLOS OTÁVIO BRANDÃO

ESCLEROSE MÚLTIPLA:

**Mediadores da resposta inflamatória associados à
ressonância magnética quantitativa**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de
Campinas para obtenção de título de Doutor em
Ciências Médicas, área de concentração em Neurologia.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. LEONILDA MARIA BARBOSA SANTOS

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. BENITO PEREIRA DAMASCENO

CAMPINAS

Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B733e Brandão, Carlos Otávio
Esclerose múltipla: mediadores da resposta inflamatória associados
à ressonância magnética quantitativa / Carlos Otávio Brandão.
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores : Leonilda Maria Barbosa Santos, Benito Pereira
Damasceno

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Citocinas. 2. Esclerose múltipla. 3. Imunoglobulinas. 4.
Líquido cefalorraquiano - Exame. 5. Neuroimagem. I. Santos,
Leonilda Maria Barbosa. II. Damasceno, Benito Pereira. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

**Título em inglês: Quantitative MRI and CSF inflammatory mediators in a
sample of brazilian multiple sclerosis population: a prospective study.**

Keywords:

- Cytokines
- Multiple sclerosis
- Immunoglobulins
- Cerebrospinal fluid - Exam
- Neuroimaging

Titulação: Doutor em Ciências Médicas

Área de concentração: Neurologia

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Leonilda Maria Barbosa Santos

Prof^o. Dr^o. José Antonio Livramento

Prof^o. Dr^o. Fernando Coronetti Gomes da Rocha

Prof^a. Dr^a. Anamarli Nucci

Prof^o. Dr^o. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Data da defesa: 23-07-2009

Banca examinadora de Tese de Doutorado

Carlos Otávio Brandão

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Leonilda Maria Barbosa Dos Santos

Membros:
 Professor (a) Doutor (a) José Antonio Livramento
 Professor (a) Doutor (a) Fernando Coronetti Gomes da Rocha
 Professor (a) Doutor (a) Anamarli Nucci
 Professor (a) Doutor (a) Alexandre Leite Rodrigues De Oliveira
 Professor (a) Doutor (a) Leonilda Maria Barbosa Dos Santos

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/07/2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Octávio e Maria de Lourdes, à minha esposa Heloísa e aos meus filhos, Caio e Olívia.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Leonilda Maria Barbosa Santos, orientadora, grande mestre e amiga, e principal responsável pelo meu ingresso na pesquisa científica.

Ao Prof. Benito Pereira Damasceno, co-orientador, pelos ensinamentos e pela excelente oportunidade de participar e aprender muito com o grupo da Neurologia da Unicamp.

Ao Prof. Fernando Cendes, co-orientador, pelos ensinamentos, abertura e grande cooperação através do Laboratório de Neuroimagem, que foi essencial para a realização deste projeto.

À Dra. Heloísa Helena Ruocco, co-autora e grande parceira, pela incansável ajuda em todos os momentos de nosso trabalho, e responsável pela análise das imagens por ressonância magnética.

Aos colaboradores deste projeto de pesquisa que ajudaram nas análises e foram amigos durante todas as fases: Alessandro dos Santos Farias, Ana Leda Longhini, Ana Maria Milani, Célia Maria Teixeira, Celina Oliveira, Cristiane da Silva Casanova, Dannie Eiko Maeda Hallal-Longo, Elaine Conceição Oliveira, Felipe Von Glehn Silva, Fernando Pradella, Francisjane de Jesus Lopes, Gaby Jéssica Rangel, Jackline Cristina Lima, Juan G. Cabanillas, Juliana de Cássia Sartorelli, Luciara Rosa de Alencar Gomes, Maria da Glória Augusto, Patrícia Luiza de Freitas Proença, Rosemeire Florença de O de Paula, Sandra Regina Mirandola e Vania Daniela Ramos.

Ao querido Prof. Dr. Antonio Spina França, grande mestre e incentivador do meu desenvolvimento científico.

Ao grande amigo Dr. Carlos Augusto Senne Soares, principal responsável pelo meu desenvolvimento no estudo do Líquido Cefalorraquiano.

Aos professores do departamento de Neurologia, pelos ensinamentos nas discussões clínicas durante o atendimento dos pacientes.

Aos colegas residentes e pós-graduandos, pela grande ajuda no atendimento aos pacientes e nas discussões clínicas.

À FAPESP pela ajuda financeira.

“Depois de tantos anos de trabalho e experiência, descobri que as idéias de meus filmes surgem em consequência do intenso desejo de concebê-las. Provocada por este desejo, a mente se torna uma espécie de torre de observação à espreita de incidentes que possam excitar a imaginação: música, crepúsculos, qualquer coisa, enfim, pode ser imagem capaz de inspirar uma idéia.”

Charles Chaplin

Esclerose múltipla é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante e neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) que apresenta intensa variabilidade clínica e prognóstico imprevisível.

Este é um estudo prospectivo com o objetivo de investigar o perfil da resposta inflamatória e a neurodegeneração em uma amostra de pacientes brasileiros com esclerose múltipla, comparando marcadores no líquido cefalorraquiano (LCR) e na imagem por ressonância magnética (IRM) quantitativa.

Um grupo de 54 pacientes com esclerose múltipla remitante-recorrente (EMRR) foi recrutado para este estudo, de acordo com os critérios diagnósticos de Poser. Os exames de IRM foram processados e as amostras de LCR coletadas durante o processo diagnóstico e após tratamento com imunomodulador (beta-interferona ou acetato de glatirâmer).

IgG e albumina no LCR e soro foram analisadas pelo método da nefelometria e a pesquisa de bandas IgG oligoclonais (BO) pela focalização isoelétrica. Citocinas, anticorpos para o vírus Epstein-Barr (EBV) e proteínas Tau foram quantificados através de kits comerciais pelo método ELISA. Os exames de IRM foram realizados com a utilização de um programa semi-automático.

Os resultados demonstraram que pacientes com EMRR, mesmo na fase de remissão, apresentam aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias no soro e LCR associados à síntese intratecal de IgG e ao aumento do número de leucócitos no LCR. Na IRM foram detectadas lesões desmielinizantes em 94.4% e a presença de bandas oligoclonais foi demonstrada em 83% dos pacientes. Durante a evolução da doença foi possível observar uma correlação positiva do índice IgG com o volume total de lesões na IRM e com o número de leucócitos no LCR. Os níveis de T-tau estavam elevados quando comparados com os indivíduos controle e atrofia cerebral foi observada desde o diagnóstico. A taxa anual de surtos e o nível de proteína T-tau no LCR foram reduzidos após o tratamento com imunomodulador, mas aumento da EDSS foi demonstrado em grande parte dos pacientes.

Com base em todas as análises, nós podemos concluir que a avaliação da IRM quantitativa e dos biomarcadores de inflamação pode ser muito útil na monitorização dos pacientes com EM, mesmo nos períodos clinicamente estáveis.

Quantitative MRI and CSF inflammatory mediators in a sample of brazilian multiple sclerosis population: a prospective study.

Multiple sclerosis (MS) is referred to as a chronic inflammatory, demyelinating, and neurodegenerative disorder of the central nervous system (CNS), with a highly variable clinical course and prognosis.

This is a prospective study to investigate the profile of inflammatory response and neurodegeneration in brazilian MS population by comparing cerebrospinal fluid (CSF) markers and quantitative magnetic resonance imaging (MRI).

A total of 54 patients with relapsing-remitting MS (RRMS) were included in this study according to Poser criteria. MRIs were performed and CSF samples were collected both during the diagnostic process and after immunomodulator treatment (beta interferon and glatiramer acetate).

IgG and albumin in the CSF and serum were measured by nephelometry and oligoclonal IgG bands were identified by isoelectrofocusing. Cytokines, Epstein-Barr virus (EBV) antibodies and Tau proteins were quantified using commercial kits by ELISA. Brain MRI examinations were performed using a semi-automated local lesion threshold technique.

The results demonstrated that patients with RRMS in stable phase of the disease reveal increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines in both serum and CSF associated with the intrathecal synthesis of IgG and the number of leucocytes in the CSF. Demyelinating brain lesions were detected by MRI in 94.4% and the presence of oligoclonal bands were observed in 83% of patients. During the evolution of the disease, it was possible to establish a positive correlation of IgG index with total lesion volume and total leukocytes count. Increased CSF T-tau levels were found in MS as compared to controls and brain atrophy was observed since the diagnosis of disease.

The both annual relapse rate and the level T-tau protein were significantly reduced after the treatment with IFN β , although many of the patients had presented an increased at EDSS.

Taken together, we provide evidence that the study of MRI and the inflammatory parameters is an useful tool for monitorizing MS patients even in the stable form of the disease.

LISTA DE ABREVIATURAS

BCR	receptores de células B para antígenos
BO	bandas oligoclonais
CD	grupamento de diferenciação de células
CTLA-4	antígeno de células T citotóxicas 4
DWI	método de difusão na ressonância magnética
EAE	encefalomielite experimental auto-imune
EBV	vírus Epstein-Barr
EDSS	escala de incapacidade
ELAM	molécula de adesão endotélio-leucócito
EM	esclerose múltipla
EMPP	esclerose múltipla progressiva primária
EMPS	esclerose múltipla progressiva secundária
EMRR	esclerose múltipla remitente-recorrente
GD+	presença de captação de gadolínio
HLA	antígeno leucocitário humano
ICAM	molécula intracelular de adesão
IFN	interferon
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12

LCR	líquido cefalorraquiano
MBP	proteína básica de mielina
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MOG	glicoproteína de mielina do oligodendrócito
MTR	taxa de transferência de magnetização
NAA	n-acetil-aspartato
NK	subgrupo de células linfóides
PLP	Proteolipoproteína
IRM	Imagem ressonância magnética
SNC	sistema nervoso central
TCR	receptores de células T para antígenos
TGF	fator transformador de crescimento
TGF	fator transformador de crescimento
Th	subgrupo de células T auxiliares
TNF	fator de necrose tumoral
VC	volume cerebral
VCAM	molécula de adesão às células do endotélio
VTL	volume total de lesões

	PÁG.
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1- INTRODUÇÃO.....	31
1.1- Descrição.....	33
1.2- Histórico.....	33
1.3- Epidemiologia.....	35
1.4- Etiopatogenia.....	38
1.5- Quadro clínico- Classificação.....	56
1.6- Patologia.....	57
1.7- Diagnóstico.....	59
1.8- Imagem por ressonância magnética na EM.....	63
1.9- Tratamento.....	65
1.10- Prognóstico.....	68
2- OBJETIVOS.....	71
2.1- Objetivos gerais.....	73
2.2- Objetivos específicos.....	73
3- METODOLOGIA.....	75
3.1- Pacientes.....	77
3.2- Amostras de LCR e Soro.....	78
3.3- Procedimentos laboratoriais.....	79
3.4- Neuroimagem.....	81
3.5- Estatística.....	85

4- RESULTADOS	87
4.1- Fase diagnóstica-Ponto1	90
4.1.1- Análise das imagens.....	90
4.1.2- Análise das amostras.....	90
4.1.3- Análise dos dados clínicos.....	90
4.1.4- Análise comparativa.....	90
4.1.5- Análise das citocinas.....	101
4.1.5.1- Dosagem de IFN γ	102
4.1.5.2- Dosagem de TNF α	103
4.1.5.3- Dosagem de IL-10.....	103
4.1.5.4- Dosagem de IL-12p40.....	103
4.2- Fase de tratamento- Ponto 2	105
4.2.1- Análise das imagens.....	105
4.2.2- Análise das amostras.....	105
4.2.3- Análise dos dados clínicos.....	105
4.2.4- Análise comparativa.....	106
4.3- Quantificação biomarcadores	109
4.3.1- Dosagem de P-tau.....	109
4.3.2- Dosagem de T-tau.....	109
4.3.3- Análise comparativa.....	109
5- DISCUSSÃO	111
5.1- Avaliação da atividade inflamatória antes do tratamento	113
5.1.1- Avaliação das citocinas no LCR e soro.....	114
5.1.2- Avaliação da resposta humoral.....	117

5.2- Avaliação da atividade inflamatória após tratamento.....	118
5.2.1- Avaliação do dano axonal.....	119
5.2.2- Avaliação dos marcadores de neurodegeneração.....	120
5.2.3- Avaliação clínica.....	121
5.3- Considerações finais.....	122
6- CONCLUSÕES.....	123
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	127
8- ANEXOS.....	173
Anexo 1- Artigo publicado: Arq Neuropsiquiat 2005.....	175
Anexo 2- Artigo publicado: Neuroimmunomodulation 2006.....	181
Anexo 3- Artigo publicado: International Immunopharmacology 2009.....	189
Anexo 4- Artigo submetido ao Journal of Neuroimmunology 2009.....	197
Anexo 5- Artigo submetido ao periódico Multiple Sclerosis Journal 2009.....	213
Anexo 6- Termo de consentimento para punção lombar.....	229
Anexo 7- Termo de consentimento para ressonância magnética.....	233
Anexo 8- Aprovação do Comitê de Ética.....	239
9- APÊNDICES.....	241
Apêndice 1- Dados clínicos e parâmetros do LCR.....	243
Apêndice 2- Dados clínicos e parâmetros do LCR.....	244
Apêndice 3- Parâmetros do LCR e captação de gadolínio na IRM.....	245
Apêndice 4- Parâmetros do LCR e captação de gadolínio na IRM.....	246
Apêndice 5- IRM quantitativa e parâmetros do LCR em pacientes EM.....	247
Apêndice 6- IRM quantitativa e parâmetros do LCR em pacientes EM.....	248

Apêndice 7- Quantificação de volume (medida de atrofia) em pacientes saudáveis.....	249
Apêndice 8- Análise das citocinas em pacientes com EM em remissão clínica.	250
Apêndice 9- Análise das citocinas em pacientes com (ODN).....	251
Apêndice 10- Análise das citocinas em pacientes com LES.....	252
Apêndice 11- Análise das citocinas em pacientes saudáveis.....	253
Apêndice 12- Quantificação de proteínas T-tau.....	254
Apêndice 13- Quantificação de proteínas P-tau.....	255

1- INTRODUÇÃO



1.1- Descrição

A Esclerose Múltipla (EM), também conhecida como esclerose em placas, disseminada ou insular é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC) resultante de uma resposta auto-imune contra antígenos da mielina. Este processo inflamatório envolve células T, células B, macrófagos, anticorpos, proteínas do complemento e citocinas (1). A EM afeta todas as porções do SNC, medula espinal, tronco cerebral, cerebelo, nervos ópticos e hemisférios cerebrais. As lesões ou placas da EM resultam da inflamação crônica da substância branca do SNC e são caracterizadas por perda da mielina e oligodendrócitos. Embora seja uma doença predominante da substância branca, as lesões podem ocorrer em todo o parênquima do SNC, incluindo substância cinzenta. Estas lesões causam múltiplos sinais e sintomas de disfunção neural. No início da doença, os mecanismos de neuroplasticidade podem contribuir para a recuperação completa ou parcial dos sintomas. Durante o curso, as áreas repetidamente afetadas desenvolvem alterações patológicas permanentes e a grande maioria dos pacientes evolui para um quadro de piora progressiva das funções neurológicas com importante grau de incapacidade. Apesar do conhecimento de vários aspectos da EM, a etiologia, prognóstico e tratamento específico ainda não estão totalmente esclarecidos.

1.2- Histórico

As características clínicas e patológicas foram descritas há mais de um século. A primeira descrição clínica foi o caso de uma freira alemã de 16 anos de idade, Lidwina van Schiedam, que adoeceu em 1296. Ela apresentava paralisia das pernas e braço direito, paralisia facial, perda bilateral da visão, alterações sensitivas e disfagia. Os primeiros relatos clínicos patológicos da EM são atribuídos a Cruveilhier (1829-1842) e Carswell (1838) apud Dejong (2). Jean Cruveilhier, professor de anatomia da Faculdade de Medicina de Paris, publicou suas primeiras descrições no segundo volume do *Anatomie pathologique du corps humain*. Robert Carswell, estudante de medicina na Escócia e Paris, desenhou, pintou e descreveu cortes de tecidos normais e patológicos que foram publicados no *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease*.

Jean-Martin Charcot, professor da clínica de doenças do sistema nervoso na Universidade de Paris, foi o primeiro a chamar a atenção do mundo para a doença. Descreveu as manifestações clínicas e sua correlação com as alterações patológicas. Muitos casos relatados por Charcot foram estudados por ele e pelo seu professor de anatomia da Faculdade de Medicina de Paris, Vulpian (1866), que apresentou pela primeira vez na literatura médica o termo esclerose em placas no evento da *Société Médicale des Hôpitaux*. Charcot (1868) apud Dejong (2) apresentou vários casos clínicos na *Société de Biologie* e neste mesmo ano descreveu detalhes histológicos das lesões da EM que podem ser encontrados nas *Les conférences de Charcot* apresentadas em Salpêtrière. Segundo Bourneville e Guérard (1869) apud Dejong (2), que foram seus alunos, Charcot conheceu melhor a doença através da observação do quadro clínico de sua empregada doméstica que evoluiu com nistagmo, tremor de intenção e distúrbio da fala. Ele diagnosticou como Tabes dorsalis, mas o exame patológico da autópsia mostrou a presença de várias lesões de esclerose. No final do século XIX, a EM já estava muito bem descrita e divulgada na literatura internacional, mas a etiologia e patogênese não estão bem definidas até hoje. Diferentes autores, ao longo deste período, sugeriram diferentes teorias para a patogênese da doença. Charcot, em suas discussões da doença, sugeriu a relação com uma doença aguda pregressa (como exemplo, febre tifóide, cólera e varíola), exposição ao frio e a fatores emocionais. Oppenheim (1887) argumentou sobre a possibilidade de ser a doença uma consequência de exposição aos metais pesados. Strumpel (1896) e Muller (1904) apud Djong (2) apontaram a existência de fatores constitucionais, uma tendência endógena de proliferação glial levando à compressão da bainha de mielina. Marburg (1906) sugeriu a teoria de uma toxina circulante mielinolítica. Bullock (1913) transmitiu a doença do homem para coelhos através de injeção subdural e subcutânea de líquido cefalorraquiano (LCR) de pacientes com esclerose múltipla. Ele concluiu, embora não tenha realizado exame histológico, que a EM era possivelmente uma doença infecciosa e o vírus poderia ser encontrado no LCR. Kuhn e Steiner (1917) descreveram a transmissão da EM para coelhos, porcos e macacos através de injeção de sangue e LCR de pacientes com a doença. Nos macacos, os achados histológicos foram analisados e interpretados como indistinguíveis das lesões de EM no homem. Os mesmos autores documentaram a presença de espiroquetas no cérebro, LCR e sangue de pacientes com a doença. Contudo, estudos

realizados posteriormente, não confirmaram a presença dos microorganismos sugerindo que os achados anteriores provavelmente eram artefatos ou contaminantes. Curtius (1933) enfatizou o fator constitucional baseado na verificação de casos familiares da doença. Outros autores apud Djong (2) associaram à deficiência de outros metais ou vitaminas essenciais.

A hipótese de origem infecciosa foi muito pesquisada ao longo dos anos e até hoje tem sido objeto de investigação, sendo a sífilis a primeira doença estudada. Dattner (1937) publicou testes positivos, através de fixação de complemento, para tuberculose em pacientes com esclerose múltipla. Outros estudos atribuíram uma causa vascular de acordo com as teorias da trombose venular (Putnam, 1933) e do vasoespasma (Franklin e Brickner, 1947) que foram elaboradas com base nas características das placas semelhantes às doenças dos pequenos vasos apud Dejong (2).

A exploração no campo da imunologia na busca da etiologia da EM foi despertada com o conhecimento da encefalomielite experimental auto-imune (EAE), no final do século XIX, como resultado da vacina anti-rábica.

1.3- Epidemiologia

A esclerose múltipla afeta aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo e cerca de 400.000 nos Estados Unidos da América (3). No Brasil, existem muitos estudos descritivos das características clínicas e epidemiológicas de diversos estados, mas poucos estudos de prevalência (4,5,6,7,8,9,10,11). Em 1990, um trabalho realizado na cidade de São Paulo (latitude sul de 23-24°) mostrou uma taxa de prevalência 4,27/ 100.000 habitantes (homens: 2,89/ 100.000; mulheres: 5,59/ 100.000) com predomínio em adultos jovens (12). Em 1997, novo estudo foi realizado nesta mesma cidade e a taxa de prevalência registrada foi de 15/ 100.000 habitantes (13). Este aumento de taxa foi atribuído ao maior número de casos incluídos no estudo e ao desenvolvimento de melhores recursos diagnósticos e terapêuticos.

Os primeiros sinais clínicos ocorrem, tipicamente, nos pacientes adultos jovens com predomínio do sexo feminino (2:1). Estudos iniciais mostraram que a doença predominava em pessoas com descendência escandinava (Bailey, 1922) (Davenport, 1922) apud Kurtzke (14). Kurtzke coletou dados epidemiológicos e sugeriu um gradiente geográfico de prevalência. No hemisfério norte, o gradiente é norte-sul onde a EM é mais prevalente no norte e oeste da Europa, Canadá e estados do norte dos EUA, diminuindo na Europa Central e estados centrais dos EUA; um gradiente semelhante foi descrito na Grã-Bretanha e Japão. Um gradiente sul-norte foi sugerido para o hemisfério sul incluindo Austrália e Nova Zelândia (15,16,17). A distribuição geográfica sugere que tanto fatores genéticos como ambientais estão envolvidos na patogênese da doença. Há referências de que a disseminação genética seja devido à influência dos vikings que atacaram a maior parte dos países europeus e se instalaram na Normandia, Sicília e sul da Itália. Nos locais por onde passaram os vikings, as taxas de prevalência da EM são maiores (18).

Os primeiros relatos sobre a possibilidade do caráter genético da EM foram descritos no final do século XIX com a identificação de agregação familiar (Eichhorst, 1896) apud Sadovnick (19). A comparação entre gêmeos homozigóticos e gêmeos dizigóticos mostrou uma taxa de concordância maior nos homozigóticos. A procura individual por genes de susceptibilidade ainda é inconclusiva, apesar dos grandes avanços na área da biologia molecular. Mais de 20 estudos analisaram o genoma completo em diferentes populações de pacientes EM e em diferentes áreas no globo. Os resultados mostraram que a EM pode ser considerada uma doença com uma complexidade genética muito grande, uma vez que os estudos de famílias afetadas realizados em relação ao genoma total não foram conclusivos (20). Com relação ao estudo dos genes pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou HLA antígeno leucocitário humano (HLA) foi observado associação da expressão de determinados haplótipos ao maior risco de EM (21,22). Este grupo de genes codifica glicoproteínas (moléculas MHC) que estão diretamente relacionadas com a fisiologia do sistema imune, mais precisamente com a imunidade adquirida, incluindo a apresentação do antígeno e a seleção negativa de clones auto-reativos no microambiente tímico (23,24). A determinação da frequência de alelos em estudos de casos-controle e a investigação de marcadores em casos familiares sugerem que as associações mais encontradas foram com os haplótipos do MHC de classe II,

HLADRB1*1501, DQA1*0102 e DQB1*0602 (19). No entanto, apenas 60% dos pacientes apresentam esta associação, evidenciando também a heterogeneidade para os genes HLA (25). Em trabalho realizado por pesquisadores nacionais, foi demonstrada a presença de haplótipos DQB1*0602-DQA1*0102 e ausência de DRB1*1501 em uma determinada população de pacientes EM brasileiros descendentes de africanos (26). Além dos genes do HLA, outros genes têm sido associados tanto com a prevalência quanto com a evolução da EM, incluindo os que codificam os membros da família dos receptores do fator transformador de crescimento (TGF β), o antígeno de células T citotóxicas 4 (CTLA-4), o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 1 (IL1) e os receptores de estrogênio (1). Esta forte associação com as moléculas envolvidas na resposta imunológica indica a natureza auto-imune da EM.

Com relação aos fatores ambientais, estudos das migrações e manifestações epidêmicas enfatizaram a contribuição do ambiente no desenvolvimento da EM. Estes fatores podem ser relacionados a infecções virais ou bacterianas, fatores comportamentais e de estilo de vida (27). Dean (1967) registrou que imigrantes na África do Sul tendem a desenvolver EM na mesma frequência que a população local. Por outro lado, as crianças nascidas de pais imigrantes da Índia e África do Sul para o Reino Unido acompanham os índices do país de destino. Alter et al. (1966) revisado por Kurtzke (28) demonstraram que a idade de migração é o fator decisivo para o desenvolvimento da EM devido à interação entre as infecções ocorridas na infância e a EM. A migração de um local de alta incidência da doença depois dos 15 anos de idade carrega o risco associado com o local de origem, enquanto que a migração antes dos 15 anos de idade assume o risco do local de destino. Embora nenhum agente infeccioso tenha sido diretamente ligado às lesões, alguns estudos mostraram evidências para a hipótese ambiental da EM, registrando epidemias da doença (14,29). Entre os agentes infecciosos, os vírus são os mais pesquisados e relacionados com a patogênese da EM, incluindo sarampo, rubéola, caxumba, EBV (Epstein Barr vírus), HSV (herpes simplex vírus), VZV (varicella zoster) e HHV6. Estudos epidemiológicos (30) e laboratoriais (31,32) mostraram associação da EM com infecção pelo EBV. Associação positiva foi encontrada em pacientes com mononucleose e elevados títulos de anticorpo contra EBNA1 (33,34), enquanto indivíduos nunca infectados pelo EBV apresentam risco baixo para EM. No entanto, o mecanismo que explique esta associação não está ainda

elucidado (35). Por outro lado, argumentos contra a participação dos agentes infecciosos no desenvolvimento da EM incluem a raridade de casos conjugais (36), baixa concordância entre gêmeos dizigóticos e a presença de grupos étnicos resistentes em áreas de alta prevalência (19). A distribuição geográfica da EM também pode ser explicada pela hipótese da vitamina D. Estudos observacionais e experimentos em modelos animais mostraram uma relação positiva da vitamina D (exposição solar ou dieta) com a melhora dos sintomas ou prevenção da EM (37,38).

1.4- Etiopatogenia

Durante muito tempo, a EM foi considerada uma desordem mediada por uma resposta inflamatória contra antígenos da mielina do SNC. Atualmente, os pesquisadores reconhecem, além do componente inflamatório, a existência de um processo neurodegenerativo ao longo do curso da doença que é responsável pela progressão da incapacidade neurológica dos pacientes e que não responde aos tratamentos com imunossuppressores (39).

Atualmente a EM é considerada uma doença auto-imune onde o sistema imunológico reconhece como antígeno as proteínas componentes da bainha de mielina.

1.4.1- Resposta imune e autoimunidade

O termo autoimunidade foi utilizado no início do século XX para descrever que os potentes mecanismos imunológicos utilizados na defesa do hospedeiro podem causar graves lesões teciduais, se voltados contra ele. Atualmente, a autoimunidade é entendida como uma reação fisiológica normal do organismo. O indivíduo convive com os clones de células potencialmente reativas para as estruturas próprias (40). Inclusive há estudos mostrando que a autoimunidade é essencial para a homeostase do organismo (41).

Assim, as células autoreativas são mantidas em homeostase devido a uma complexa interação de mecanismos imunológicos que resultam no fenômeno conhecido como tolerância imunológica. A tolerância aos auto-antígenos é ativamente conseguida e os

linfócitos, tanto B como T, potencialmente auto-reativos são passíveis de se tornarem tolerantes. O processo de indução de tolerância dos linfócitos T ocorre durante o processo de maturação do timo conhecido como tolerância central.

Apesar do processo de indução de tolerância central, os linfócitos T potencialmente auto-reativos deixam o timo e são mantidos sob controle do organismo devido aos mecanismos de tolerância periférica. Os principais mecanismos de tolerância periférica são: a destruição das células auto-reativas, a indução de anergia nestas células ou a obtenção de supressão ativa obtida pela ativação de células reguladoras e/ou a produção de citocinas com ação antiinflamatória.

A morte celular programada por apoptose é um mecanismo central na embriogênese e morfogênese, sendo essencial no desenvolvimento do sistema imunológico e do sistema nervoso, na eliminação de células senescentes e células indesejáveis (neoplásicas e outras), na destruição de células infectadas por vírus e ainda na resposta a estímulos agressivos. Os estudos ressaltam uma distinção clara entre necrose e apoptose. A necrose é uma forma de morte celular degenerativa e incontrolável, provocada normalmente por um estímulo ambiental agressivo: hipertermia, radiação e uma variedade de agentes físicos e químicos, entre outros. O mecanismo de apoptose também pode ser desencadeado por estes agentes, mas é essencialmente um processo fisiológico. A morte celular programada por apoptose envolve o reconhecimento de um sinal específico e a intervenção de sistemas complexos de regulação. Os linfócitos entram em apoptose em resposta a uma série de estímulos. Timócitos imaturos e linfócitos T entram em apoptose quando ativados através dos receptores para antígeno TCR (*T cell receptor*). A indução de apoptose pela ativação (*activation-induced death*) dos timócitos é um importante componente da seleção negativa e estabelecimento da tolerância aos antígenos próprios, durante a indução da tolerância central. Este processo de morte celular também é acionado na manutenção da tolerância periférica (42). FAS é uma molécula pertencente à superfamília do receptor TNF/nerve growth factor (43,44), também conhecida como APO-1 ou CD95, que está implicada na indução de apoptose dos linfócitos. A junção desta molécula com o seu ligante específico (FAS-L) acionam o mecanismo de apoptose em linfócitos normais ou em transformação (45). A participação da molécula FAS na manutenção da tolerância aos

auto-antígenos foi confirmada pela demonstração que camundongos *lpr*, deficientes em FAS, e de *gld*, deficientes em FASL, apresentam defeito nos mecanismos de apoptose dos clones auto-reativos levando ao desenvolvimento de doenças auto-imunes (46).

O mecanismo de anergia clonal e o seu envolvimento na manutenção da tolerância imunológica estão intimamente ligados com a apresentação do antígeno. As células apresentadoras de antígeno (macrófagos, células dendríticas e linfócitos B) convertem antígenos protéicos em peptídeos e os mesmos são apresentados pelo complexo MHC-peptídeo às células T que reconhece esse complexo através de moléculas dos receptores para o antígeno TCR. As moléculas de MHC de classe II através de ligação bioquímica específica apresentam o peptídeo antigênico aos linfócitos T CD4. Estas células também conhecidas como T helper contribuem para amplificar a resposta imune, tanto celular como humoral, através da produção de citocinas. As moléculas MHC de classe I apresentam o peptídeo antigênico aos linfócitos T CD8 ou citotóxicos. Esse processo de reconhecimento é o primeiro sinal para a posterior ativação dos diferentes tipos de linfócitos T. No entanto, apenas o reconhecimento do peptídeo ligado às moléculas MHC pelo TCR, não é suficiente para iniciar a ativação linfocitária. É necessário que um segundo sinal seja acionado, ou seja, tanto as células T como as células APC expressam moléculas co-estimulatórias que participarão também da apresentação e ativação dos linfócitos T. As moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80) e B7.2 (CD 86) são expressas nas células apresentadoras do antígeno e se ligam às moléculas CD28/CTLA4, que são expressas nos linfócitos. A ligação das moléculas CD80/CD86 com CD28 levará um sinal positivo de ativação para os linfócitos, enquanto a ligação destas mesmas moléculas com a molécula de CTLA4 sinalizará negativamente para a ativação linfocitária. Trabalhos recentes mostram que as moléculas CTLA4 estão envolvidas na ativação de células reguladoras (47). Na ausência de expressão das moléculas co-estimulatórias, os linfócitos não são ativados mesmo sensibilizados ao antígeno, fenômeno conhecido como anergia clonal.

A manutenção da tolerância pela supressão ativa envolve a complexa interação entre as células potencialmente auto-reativas e as células com atividade reguladora, que podem atuar tanto através do contato célula/célula como através do aumento de citocinas com ação antiinflamatória.

As citocinas são glicoproteínas produzidas por vários tipos celulares que através da ligação com receptores específicos possuem a função de sinalizar e facilitar a comunicação entre as células do sistema imune e dos demais sistemas que constituem os indivíduos. As citocinas são frequentemente pleiotrópicas e reduntantes. O pleiotropismo refere-se à habilidade de uma citocina agir em diferentes tipos celulares. Essa propriedade permite a uma citocina mediar diferentes efeitos biológicos, mas também pode limitar seu uso terapêutico, pois o uso de uma citocina para um efeito clínico desejado pode resultar em efeitos colaterais indesejáveis. A redundância refere-se à propriedade de múltiplas citocinas possuírem os mesmos efeitos funcionais. Ainda as citocinas podem agir localmente sobre as células que as secretam (ação autócrina) ou em células próximas (ação parácrina). Quando produzidas em grande quantidade, elas podem entrar na circulação e atuar distante do local da produção (ação endócrina). A produção local nos tecidos e a meia vida curta implicam que determinações simples dos seus níveis nos líquidos corporais não trazem muitas informações. A determinação no nível celular e no compartimento em que foi produzida pode permitir melhores conclusões. A interpretação dos achados com base nos níveis de citocinas não é fácil em função de suas interações em rede. A rede de citocinas é extremamente complexa e as evidências demonstram sua importância na fisiopatologia da EM.

Há aproximadamente duas décadas, Mossman e Coffman (48) descreveram a heterogeneidade das populações de linfócitos T CD4 com base na produção de algumas citocinas. Os linfócitos T CD4 produtores de citocinas, como IL2, IFN γ e linfotoxinas, foram classificados como T helper 1. Estas células estão preferencialmente envolvidas na resposta imune celular e na síntese de algumas subclasses de imunoglobulinas. Os linfócitos T CD4 produtores de IL4, IL5, IL10 e IL13 foram classificados como T helper 2 e estão envolvidos na inibição da resposta inflamatória, além de auxiliar na síntese de anticorpos. Recentemente, foram descritos os subtipos Th3 (49) e T helper 17 (50). A população de linfócitos Th3 produtora da citocina TGF β , que possui importante função imunoreguladora, foi descrita no processo de indução de tolerância oral aos antígenos da mielina, sendo preferencialmente secretada na mucosa intestinal (51). A subpopulação Th17 parece ter um papel essencial contra certos patógenos extracelulares, além de atuar na indução da inflamação e doenças auto-imunes (52). A diferenciação dos subtipos de

linfócitos T CD4 é resultado direto da resposta imune inata. As células apresentadoras de antígeno iniciam e orquestram a subsequente resposta linfocitária. Vários estudos mostraram que a predominância de IL-12 no microambiente onde o antígeno é apresentado favorece a diferenciação dos linfócitos Th1 produtores de IFN γ (53), ou seja, um braço pró-inflamatório de resposta imune (54). Por outro lado, níveis elevados de IL-4 favorecem a diferenciação dos linfócitos Th2 (55).

A produção dos anticorpos pelos plasmócitos, derivados dos linfócitos B, está diretamente ligada à secreção das citocinas. Os linfócitos B reconhecem o antígeno através do seu receptor para o antígeno BCR (B cell receptor) que consiste em uma molécula de imunoglobulina de superfície. No caso de antígenos proteicos, o antígeno é endocitado e apresentado como complexo MHC de classe II/peptídeo aos linfócitos Th2. Esta cooperação entre linfócitos e posterior secreção das citocinas é essencial para a diferenciação, expansão das células e síntese de anticorpos.

Os linfócitos T CD8 através da liberação de enzimas como a perfurina e as granzimas são responsáveis pela destruição das células do hospedeiro infectadas por vírus, outros parasitas intracelulares ou células neoplásicas. No entanto, a resposta citotóxica destas células pode ser danosa ao organismo, quando voltada para os componentes próprios.

Estas complexas interações do sistema imunológico no sentido de amplificar a função protetora são reguladas com objetivo de manter a homeostase do sistema imune.

Na década de 70, Gerson e Kondo (56) descreveram a existência de linfócitos com a função de suprimir a resposta imunológica. Até o momento, muito empenho tem sido feito no sentido de entender a ontogenia, função e os mecanismos de ação de células com função supressora ou imunoreguladora. A ativação destas células é essencial para a manutenção da tolerância periférica aos auto-antígenos. A diferença entre estas populações celulares está baseada no padrão de citocinas que elas produzem ou na capacidade de suprimir a resposta imune pela interação célula/célula. No entanto, os mecanismos envolvidos na interação destes diferentes subtipos celulares não estão completamente elucidados. Dentro da população de linfócitos T CD4, pelo menos três tipos diferentes de

células reguladoras foram descritos: os linfócitos Th3, as células reguladoras tipo I (Tr1) e os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺.

Os linfócitos reguladores T CD4 (Th3) foram identificados nos estudos de indução de tolerância oral. Os linfócitos Th3 participam nesta forma de tolerância com o objetivo de atenuar a resposta das proteínas imunogênicas previamente apresentadas à mucosa intestinal. Dessa forma se obtém importante supressão, tanto da resposta humoral quanto daquela mediada por células, após a administração do antígeno por via oral e subsequente imunização sistêmica com o mesmo antígeno (57). Camundongos tolerizados, oralmente, com a proteína básica de mielina geram linfócitos Th3 nas mucosas intestinais, que reduzem a gravidade da encefalomielite experimental autoimune (EAE) através do aumento na produção de TGFβ.

As células Tr1 foram inicialmente descritas como linfócitos T CD4⁺ que quando ativados na presença de IL 10 tornavam-se anérgicos. A análise das células anérgicas mostrou que as mesmas produziam níveis elevados de IL-10 e TGFβ, moderadas concentrações de IFNγ e IL-5, e praticamente não produziam IL-2 ou IL-4. Essas observações indicam que os linfócitos T CD4 anergizados pela IL-10 contém precursores de Tr1 e que a IL-10 é o fator crítico para sua diferenciação, ao contrário das células Th3 (58,59,60). Além das populações Tr1 e Th3, os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ atuam como importantes moduladores da resposta imune (61).

Por muitos anos, a IL-2 foi considerada a citocina mais importante para a proliferação das células T. No entanto, foi demonstrado que animais deficientes para IL-2 não apresentavam alterações significativas no desenvolvimento e função dos linfócitos T (62). Ao contrário do esperado, camundongos geneticamente deficientes para a produção de IL-2 desenvolvem uma síndrome auto-imune linfo-proliferativa fatal, que subsequente ficou conhecida como síndrome da deficiência da IL-2 (63,64,65,66,67). Além disso, foi possível reduzir os danos causados pela doença diabética experimental através da administração de IL-2. A neutralização da atividade desta citocina, através da administração de anticorpos in vivo, resultou na indução de gastrite e neurite auto-imune nos animais estudados (68). Estas evidências indicam que a IL-2 deve contribuir para a

manutenção da tolerância natural e prevenção de doenças auto-imunes. O efeito benéfico da IL-2 na evolução das doenças auto-imune está associado ao fato desta citocina estar envolvida na diferenciação e função das células CD4 que expressam cadeia α do receptor para IL-2 (CD25) (68,69). As células T reguladoras (CD4+CD25+) constituem 5-10% dos linfócitos CD4 circulantes e a expressão do fator de transcrição Foxp3 parece estar associado ao desenvolvimento e função dessas células, tanto em camundongos como em humanos (68,70). Anormalidades na expressão e função dessa população celular levam ao aparecimento de doenças auto-imune, sugerindo a importante função reguladora destas células (61,68,70). Trabalho relativamente recente demonstrou deficiência na função das células regulatórias T CD4+CD25+ no sangue periférico dos pacientes com Esclerose múltipla (71).

A atividade supressora das células T CD4+CD25+ está relacionada à sua capacidade de inibir a resposta proliferativa dos linfócitos; normalmente, essa atividade requer o contato célula /célula e envolve a expressão da molécula CTLA4 (72,73,74,75,76). A produção de citocinas com efeito antiinflamatório pelas células T CD4+CD25+ ainda gera controvérsia. Alguns estudos falharam em detectar produção de IL-10 e TGF β pelas células T CD4+CD25+ humanas (77), enquanto outros demonstraram a produção destas citocinas em resposta a vários estímulos (78,79,80). Foi demonstrado que moléculas de TGF β ligadas à membrana das células T CD4+CD25+ são responsáveis, pelo menos em parte, pela supressão da resposta imune (81).

1.4.2- Resposta imune nos processos de desmielinização.

Muito do conhecimento adquirido sobre a participação da resposta imunológica na EM se deve ao estudo desenvolvido no modelo experimental, a encefalomielite experimental auto-imune (EAE). A EAE começou a ser estudada após a descoberta da vacina contra a raiva por Pasteur, em 1875. Esse tratamento consistia em inocular o vírus cultivado no sistema nervoso central de animais de experimentação. Devido à presença de mielina na preparação, alguns indivíduos desenvolveram casos esporádicos de encefalomielite pós-vacinal (82). A EAE foi descrita em 1933 por Rivers; Sprunt e Berry

observaram os sinais clínicos de encefalomielite após a inoculação de mielina de coelho em macacos Rhesus. Por suas semelhanças clínica, morfológica e histopatológica, a EAE passou então a ser considerada modelo experimental para o estudo dos mecanismos imunopatológicos nas doenças inflamatórias desmielinizantes de natureza auto-imune, como a EM. A doença pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis pela imunização com mielina e seus componentes, como a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP), glicoproteína associada à mielina (MAG), glicoproteína de mielina do oligodendrócito (MOG) e peptídeos encefalitogênicos derivados desses antígenos. A EAE pode ser transferida para animais normais por linfócitos T CD4 sensibilizados com os diferentes neuro-antígenos, sendo portando uma doença causada por linfócitos T (83,84).

A EAE ativamente induzida consiste de uma fase indutora e de uma fase efetora. A fase indutora envolve a apresentação de epítomos de mielina aos linfócitos T CD4⁺ nos órgãos linfóides e a subsequente expansão e diferenciação dessas células em células efetoras, que secretam de forma predominante as citocinas pró-inflamatórias. A fase efetora da doença compreende a migração de linfócitos T CD4 específicos para mielina para dentro do SNC, após a quebra da barreira hemato-encefálica (BHE). No parênquima ocorre a apresentação dos epítomos da mielina às células T por células apresentadoras de antígeno do SNC. Concomitantemente, há expressão de fatores solúveis como as quimiocinas e citocinas por células T encefalitogênicas e por células residentes do SNC, como astrócitos e micróglia, que combinados recrutam fagócitos mononucleares para o parênquima do SNC. As enzimas proteolíticas e radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) liberados principalmente por macrófagos e micróglia ativados também atuam na indução das reações inflamatórias do SNC (85,86). Recentemente, Farias e colaboradores (87) mostraram a participação ativa do NO, no modelo de EAE induzida em camundongos. Camundongos geneticamente deficientes para NO sintase induzida apresentaram uma doença menos grave, quando comparados aos animais não modificados geneticamente.

Estudos realizados no modelo da EAE mostraram a importante participação das citocinas nos mecanismos de lesão e proteção das estruturas do SNC. A EAE foi inicialmente descrita como uma doença mediada por linfócitos Th1 produtores de IL-2,

IFN γ , linfotóxina (LT)- α . As evidências mostraram o efeito danoso do IFN γ na evolução da doença (85). Posteriormente, estas observações foram reforçadas com a descrição da IL-12 induzindo níveis consideráveis de IFN γ , que estavam associados ao aumento da gravidade da doença (88). No entanto, a observação de animais geneticamente deficientes para IFN γ ou receptor para IFN γ desenvolvendo EAE sugeriu a existência de uma outra subpopulação de linfócitos efetores no modelo da EAE (89,90,91). Desta forma, recentes estudos mostraram o importante papel da IL-17 no desenvolvimento da EAE (92). A diferenciação dos linfócitos Th17 é regulada por uma complexa rede de citocinas. Enquanto o TGF β promove a diferenciação de linfócitos T reguladores que apresentam a capacidade de inibir a resposta inflamatória, a presença de IL-6 produzida pela resposta imune inata no microambiente onde a resposta imune acontece somada ao efeito de TGF β , promove a diferenciação das células Th17 (93). As citocinas IL-6 e TGF β induzem as células T naïve a secretarem IL-21 (94). Por sua vez, a IL-21 funciona de forma autócrina e aumenta o fator de transcrição da linhagem Th17 ROR γ t aumentando a expressão de IL-17 (95,96). A IL-23 atua na expansão e manutenção da população dos linfócitos Th17 contribuindo para o aumento da gravidade da EAE (94,97). Além da IL-6 e TGF β , outras citocinas incluindo a IL-1, IL-13, IL-18, IL-22, IL-23 e TNF α participam da diferenciação e expansão da Th17 (93). Por outro lado, alguns estudos demonstraram que citocinas como a IL-4, IFN γ e IFN α inibem a expansão das Th17 mediadas pela IL-23 (98). A IL-27, membro da família IL-12/IL-23 também foi descrita como um potente regulador negativo da diferenciação da Th17. Trabalho recente mostra que a IL-27 inibe a diferenciação da Th17 e a ausência de expressão da IL-27 aumenta a diferenciação e infiltração das células T produtoras de IL17 nos tecidos do SNC, contribuindo para a exacerbação da EAE (99).

Na fase de recuperação da EAE, citocinas antiinflamatórias como IL-10 e TGF β foram identificadas, tanto no sistema nervoso central como na periferia. Vários trabalhos mostraram a importante ação da IL-10 no controle da EAE, através do seu efeito imunoregulador (100). Animais com EAE entram na fase de recuperação quando a doença é induzida em animais deficientes para IL-10 (101). A expressão de IL-10 está aumentada no SNC de animais na fase de recuperação da EAE (102) e a administração exógena de IL-10 induz significativa redução da gravidade da doença (103). Recentemente, a função reguladora dos linfócitos B que produzem IL-10 foi mostrada no modelo de EAE,

sugerindo o importante papel dos linfócitos B também na regulação dessa doença (104). O TGF β pela sua conhecida ação imunossupressora também está envolvido no controle dos processos de desmielinização. O aumento da produção de TGF β no sistema nervoso central foi observado na fase de recuperação da EAE (85). Recentemente, foi descrita a atuação do TGF β na ativação de células T reguladoras com conseqüente redução da gravidade da EAE (93).

Da mesma forma que foi descrito para o modelo animal, os linfócitos T CD4 reativos aos componentes da mielina parecem essenciais para o desencadeamento da resposta inflamatória na EM. Embora a EM seja doença órgão-específica com resposta imune voltada para os componentes do SNC, estudos mostram uma série de alterações imunológicas no LCR e sangue periférico, com a participação dos linfócitos T CD4, resultando na alteração no padrão de síntese de citocinas e de seus receptores (105). Trabalho realizado por Ota e colaboradores (106), confirmado em nosso laboratório (107), mostra que os linfócitos do sangue periférico de pacientes com EM são ativados pelas proteínas componentes da mielina. Além disso, a importância dos linfócitos T CD4 no início da resposta inflamatória é enfatizada pelo impacto favorável no curso da EM do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-integrina alfa 4 (natalizumabe). Este anticorpo age sobre esta molécula expressa na superfície de linfócitos T e tem a função de inibir a migração destas células para o SNC.

A gênese das lesões na EM, portanto, são atribuídas à ação dos linfócitos T CD4 autoreativos que migram para o SNC em conseqüência da quebra dos mecanismos de tolerância periférica. Algumas hipóteses tentam explicar os mecanismos imunológicos responsáveis pela quebra da tolerância imunológica nos pacientes com EM. O mecanismo de mimetismo molecular entre as moléculas da mielina e agentes infecciosos está bem descrito na literatura. A exposição das células potencialmente auto-reativas aos patógenos exógenos pode levar a uma ativação de células T e B, como conseqüência de homologia estrutural entre um determinado neuro-antígeno e proteínas de bactérias ou antígenos virais (108). É reconhecido que componentes da mielina apresentam homologia com proteínas dos vírus do sarampo, influenza, herpes, papiloma e outros vírus. Estes patógenos conseguiram uma homologia suficiente para ativar células T específicas para mielina e

dirigir uma resposta imune patológica (109). Em estudo muito elegante conduzido por Wucherfening e colaboradores (110), os autores mostraram a homologia de peptídeos de antígenos virais com a proteína básica de mielina. A quebra dos mecanismos de tolerância também pode ser explicada pela ativação policlonal inespecífica gerada por agentes infecciosos, que normalmente apresentam complexa estrutura molecular. As células auto-reativas que se encontravam anérgicas podem ser ativadas nesse processo, resultando nas lesões auto-imunes (111). Os clones autoreativos em estado de anergia também podem ser ativados pela produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas em decorrência de uma infecção. O IFN γ pode induzir o aumento da expressão das moléculas de MHC e das co-estimulatórias na membrana de macrófagos, resultando na expansão dos clones autoreativos.

Após ativação na periferia, as células T podem migrar através da barreira hemato-encefálica e liberar citocinas dentro do SNC. Estas citocinas inflamatórias promovem o recrutamento de células fagocitárias (macrófagos da periferia e micróglia do SNC) que vão promover o ataque da mielina. Inicialmente (fase inflamatória da doença), 85% dos pacientes apresentam ataques agudos (surtos) com recuperação completa dos sinais e sintomas. Estes surtos são atribuídos a ondas de células Th1 e Th17 que infiltram o SNC. O balanço entre estas células e as células reguladoras é decisivo na determinação da atividade da doença. A fase progressiva da doença é reconhecida como secundária ao processo degenerativo desencadeado pela inflamação (112).

O mecanismo de migração das células para o sistema nervoso central é complexo e depende do contato íntimo das células autoreativas e moléculas expressas no endotélio vascular. Normalmente, as células endoteliais apresentam baixa adesividade aos leucócitos; no entanto, quando estimuladas pelas citocinas liberadas pelas células inflamatórias, as células endoteliais expressam proteínas necessárias para que os leucócitos possam aderir e migrar para o tecido inflamado. Três proteínas de adesão foram identificadas no endotélio humano e são particularmente importantes na migração dos leucócitos no endotélio do SNC. A molécula de adesão às células do endotélio-1 (VCAM-1) é membro da super família das imunoglobulinas e está particularmente envolvida na ligação dos linfócitos T ao endotélio (113) e, em menor proporção, dos

monócitos (114). A molécula intracelular de adesão-1 (ICAM-1, CD54) também pertence a super-família das imunoglobulinas e acredita-se que está constitutivamente expressa nas células endoteliais e envolvida na adesão dos neutrófilos, linfócitos e outras células que expressam a integrina LFA-1. A molécula de adesão endotélio-leucócito (ELAM-1, E-selectin) é membro da família das selectinas e está presente no endotélio venular inflamado, ligando-se aos neutrófilos, monócitos e linfócitos T CD4. Todas estas moléculas participam do processo inflamatório de forma geral e nos mecanismos de desmielinização auto-imune em particular (115). As expressões de ICAM-1 (115), VCAM-1 (116) e, E-selectin (117,118) foram descritas nos microvasos cerebrais na EM, evidenciando que esses endotélios estavam ativados pela reação inflamatória. Por outro lado, estas moléculas podem se destacar das células endoteliais ativadas e este fenômeno tem sido associado com a tentativa de impedir o acúmulo de leucócitos no endotélio inflamado ou ativado (117). Assim, a presença delas nos fluidos é indicativa da importância do endotélio ativado na fisiopatologia da EM. Níveis aumentados de ICAM-1 no soro e no LCR de pacientes com EM aguda foram descritos previamente (119,120,121). As células endoteliais dos capilares do SNC não são fenestradas e os linfócitos T ativados, que expressam VLA-4 (very late antigen-4), são capazes de atravessar a barreira por diapedese através da sua ligação com moléculas de adesão (integrinas) expressas na superfície do endotélio inflamado. Em lesões agudas da EM, VLA- 4 é encontrado no infiltrado linfocitário perivascular e as moléculas de adesão (VCAMs) são encontradas na superfície do endotélio inflamado (122). Os linfócitos T ativados, após atravessarem o endotélio vascular, precisam vencer uma barreira de matriz extracelular composta por colágeno tipo IV. As metaloproteinases, gelatinases A e B, são fundamentais para facilitar a chegada dos linfócitos na substância branca do SNC e são detectáveis no LCR de pacientes com EM; a gelatinase B está presente nas lesões de EM, nas células endoteliais, macrófagos e astrócitos (123). Estas metaloproteinases são bloqueadas por inibidores (TIMPs) que estão presentes no LCR de pacientes com EM e podem interromper a desmielinização. A resolução espontânea de muitas exacerbações clínicas na EM é comum e os níveis de TIMP-1 estão aumentados durante surtos agudos da EM; TIMP-1 é induzida por citocinas incluindo TNF α .

Após atravessarem a barreira hemato-encefálica, as células T patogênicas são reativadas por fragmentos dos antígenos da mielina. Primeiramente, elas interagem com as células apresentadoras de antígeno no espaço perivascular antes de penetrar no parênquima. Esta reativação promove liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a micróglia e a quimiotaxia, resultando em ondas adicionais de células inflamatórias recrutadas e liberação de anticorpos e outras proteínas plasmáticas para dentro do SNC (124). As células T auto-reativas necessitam da presença do recrutamento secundário dos leucócitos para produzir ou induzir a lesão tecidual. Quando as células atingem a substância branca do SNC, a resposta imune é direcionada para diferentes antígenos da mielina com participação de anticorpos, ativação da cascata do complemento e células B, que produzem citocinas que estimulam os macrófagos a fagocitarem as frações da mielina levando a desmielinização. (125).

Semelhante ao que foi descrito para o modelo animal, as citocinas produzidas na periferia ou dentro do SNC tem papel fundamental na evolução ou reparo da reação inflamatória da EM. Trabalhos sugerem que as citocinas no cérebro possuem um compartimento neural (expressadas constitutivamente) e um compartimento glial (expressadas em resposta a estímulos periféricos ou resposta imune local) (126). As citocinas produzidas na periferia são capazes de atravessar a barreira hemato-encefálica, mas para agirem localmente e induzirem a resposta imune necessitam de ligação com receptores apropriados. Alguns receptores para citocinas foram descritos em células do SNC (127). As células residentes no sistema nervoso são capazes de produzir citocinas; neurônios e células da glia produzem IL-1; os astrócitos produzem IL-1, IL-6, TNF α e TGF β 2; a micróglia produz TGF β , IL-1, IL-6 e TNF- α (128,129,130).

As citocinas com ação pró-inflamatória aumentam a resposta inflamatória e consequentemente, o dano à mielina. Estudos com IL-1, TNF α e IFN γ demonstraram a capacidade destas citocinas de induzirem desmielinização. Trabalho clássico mostrou que a administração de IFN γ aos pacientes com EM levou a significativa piora dos sintomas clínicos (131). Estudos imunohistoquímicos revelaram a presença de TNF α e TNF β nas lesões desmielinizantes agudas e crônico-agudas na EM (132). Durante os períodos de surto da EM, os níveis séricos de TNF α estão elevados e alguns autores acreditam que a

determinação de TNF α , tanto no sangue periférico como no LCR, pode ser utilizada para prever o aparecimento dos surtos (133). Estudo realizado com um grupo de pacientes brasileiros, portadores de EM, demonstrou um aumento dos níveis de receptores de TNF α , no soro e no LCR, durante o surto e remissão sem diferença significativa entre os dois grupos. Estes resultados sugerem a existência de inflamação contínua no SNC, apesar da ausência de sinais clínicos de atividade da doença (134).

Além das citocinas, classicamente conhecidas como pró-inflamatórias, a associação entre a síntese de IL-17 e piora da clínica na EM também foi observada. Trabalhos prévios mostraram que a expressão de IL-17 é maior nas células mononucleares do sangue e LCR (135), enquanto que IL-6 é mais abundante no tecido cerebral destes pacientes com EM (136). A expressão e produção de IL-23 são muito maiores nas células dendríticas mielóides dos pacientes EM do que em controles saudáveis, sugerindo um mecanismo de expansão das células Th17 nestes pacientes (137). Exames realizados em tecido cerebral de pacientes com EM mostraram expressão de IL-23p19 nas lesões agudas e crônicas, indicando a participação desta citocina na perpetuação da resposta inflamatória (138).

Por outro lado, as citocinas com ação antiinflamatória como a IL-4, IL-10 e TGF β estão associadas à redução da resposta inflamatória dos pacientes com EM. As citocinas antiinflamatórias podem agir no SNC modulando e diminuindo a resposta imune (139). Alguns autores, estudando leucócitos do sangue periférico, demonstraram que pacientes com a doença ativa produzem níveis reduzidos de TGF β quando comparados ao grupo controle (140). Já no LCR foi demonstrado aumento significativo dos níveis de TGF β na fase de remissão da EM (132,141). Estas evidências sugerem a importância das citocinas com ação supressora no controle dos surtos e remissões na EM. A produção de citocinas antiinflamatórias pode estar diretamente ligada à ativação de linfócitos ou células dendríticas imunoreguladoras. Viglieta e colaboradores (71) demonstraram que pacientes com EM apresentam função deficiente das células T reguladoras CD4+CD25+. Drogas imunomoduladoras como natalizumabe e beta-interferona, que impedem o acesso ao SNC das células autoreativas ativadas, são benéficas para o controle da EM. Esses fármacos

podem agir tanto na ativação de células reguladoras como na polarização da produção de citocinas antiinflamatórias.

Apesar das evidências sobre a importância das células T CD4⁺ na EM, o envolvimento de outras células como os linfócitos T CD8⁺, linfócitos B, células NK e fatores solúveis como os anticorpos e complemento não pode ser ignorado. Estudos prévios mostraram que os linfócitos T CD8⁺ estão associados ao dano dos neurônios. De fato, neurônios e axônios expressam moléculas MHC de classe I, deixando-os vulneráveis às células T citotóxicas (142). É possível que os peptídeos da mielina sejam apresentados por essa via aos linfócitos T CD8⁺, que por sua vez promove o dano axonal direto. Essa hipótese é corroborada pela observação dos linfócitos T CD8⁺ nas lesões de pacientes com EM (143,144,145).

Os linfócitos B e os anticorpos também ocupam lugar de destaque na reação inflamatória que leva a desmielinização na EM. Os dados histológicos sugerem que a diferenciação, maturação e secreção de anticorpos pelas células B ocorrem nos espaços de Virchow-Robin e nas meninges, que podem assumir características de linfonodos secundários. Células B específicas contra a mielina foram detectadas no cérebro e no LCR de indivíduos afetados. Os anticorpos podem participar na destruição da mielina e dano axonal através de diferentes mecanismos como a opsonização (facilitação da fagocitose), fixação de complemento ou citotoxicidade dependente de anticorpo pela ligação com células natural killer (146,147). Auto-anticorpos foram detectados em fragmentos de mielina de alguns pacientes (148,149). Síntese intratecal de IgG detectada pela pesquisa de bandas oligoclonais IgG pelo método da focalização isoeletrica está presente em mais de 90% dos pacientes com diagnóstico clinicamente definido de EM (150). Alguns autores mostraram que a ausência de síntese intratecal de IgG está relacionada com um curso mais benigno da doença (151). Por outro lado, outros autores sugerem que pacientes com maior síntese quantitativa de IgG no LCR apresentam maior progressão da doença medida pela escala da EDSS (152). Também existem evidências indiretas da participação de anticorpos IgM na EM pela participação conjunta das imunoglobulinas e fragmentos de complemento ativado nas placas agudas e a correlação da síntese intratecal de IgM com a síntese de C3 e os níveis de proteína básica da mielina no LCR (153,154). Outros trabalhos demonstraram que

a síntese intratecal de IgM está associada com escores mais elevados na escala EDSS e que sua presença nas fases iniciais da doença pode ser um potencial marcador prognóstico (155,156,157).

Achados recentes demonstraram o acúmulo de células B, infectadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV), em folículos intrameningeos e nas lesões da substância branca e são os prováveis alvos da resposta citotóxica. Estes achados podem estar relacionados a ativação contínua de células T e B na EM (158). O tratamento que remove células linfomononucleares através do anticorpo monoclonal contra CD52 (alemtuzumabe), sem indicar diretamente as células $CD4^+$ ou $CD8^+$, tem produzido uma profunda redução na atividade inflamatória, indicando o envolvimento destas células na inflamação do SNC na EM (159). Outro ensaio clínico com rituximab (anticorpo monoclonal específico para CD20) mostrou uma rápida redução na atividade da doença medida pela IRM, indicando o envolvimento das células B no desenvolvimento das lesões agudas (160).

1.4.3- Neurodegeneração

Paralelamente ao conhecimento dos mecanismos da inflamação na EM, há a preocupação com a pesquisa dos mecanismos envolvidos na progressão da EM (112,161,162). A degeneração axonal é o principal fator de incapacidade neurológica permanente dos pacientes. Após 10 anos de doença, 40-45% dos pacientes evoluem para a forma crônica progressiva independente da ocorrência de surtos. Este processo degenerativo provoca perda de axônios, lesão difusa da substância branca e envolve a substância cinzenta profunda e cortical. O papel da resposta inflamatória no componente degenerativo ainda não está claro, mas provavelmente os mecanismos são diferentes daqueles responsáveis pelo início das lesões agudas (163). O dano axonal, que ocorre nos surtos agudos de desmielinização, termina em poucas semanas. Em contraste, a degeneração axonal continua nas placas inativas e provavelmente este dano acumulado contribui para a progressão e irreversibilidade da deficiência neurológica (164,165).

Ainda não se sabe se o processo desmielinizante é pré-requisito para a lesão axonal na EM. Desmielinização resulta em redução no suporte para os axônios, redistribuição dos canais iônicos, desestabilização dos potenciais de membrana dos

axônios, redução na excitabilidade e bloqueio de condução. Inicialmente, os axônios se adaptam e restabelecem a condução, o que explica a remissão clínica, mas eventualmente ocorre degeneração distal e retrógrada. Evidências sugerem que a lesão axonal é mediada diretamente pelos macrófagos e linfócitos T CD8⁺ e microglia. Anticorpos específicos e complemento também podem mediar o dano axonal (166). As células residentes (microglia) ativadas no processo inflamatório provavelmente são as principais responsáveis pelo dano tecidual do SNC através da liberação de NO, radicais de oxigênio, aminas vasoativas, complemento, proteases e citocinas (167). O aumento dos níveis de NO foram associados aos sintomas neurológicos como resultado da lesão direta dos oligodendrócitos e axônios (168,169). NO também está envolvido no efeito excitatório do glutamato que é liberado em excesso pela microglia e macrófagos. Esta liberação acompanhada da diminuição da recaptação e metabolismo do glutamato ativa a AMPA, que é extremamente tóxica para os oligodendrócitos e neurônios. Outra fonte de liberação de glutamato é o astrócito (170). A liberação de glutamato pode ocorrer após a produção de TNF α pela microglia, o que pode levar a morte neuronal por apoptose (171). Alguns trabalhos demonstraram a expressão e função do receptor NMDA nos oligodendrócitos (172,173). Em condições patológicas, a estimulação dos receptores NMDA pode provocar dano nos oligodendrócitos. Alguns estudos sugerem que os axônios desmielinizados cronicamente podem degenerar pela falta de suporte da mielina e dos oligodendrócitos (174).

Quando os mecanismos moleculares de dano axonal são ativados, o processo culmina na degradação das proteínas do citoesqueleto e desintegração neuronal (175). Estudos patológicos indicam que cerca de 70% dos axônios são perdidos do trato corticoespinhal lateral nos pacientes com paraparesia avançada (176). Considerando a importância do dano axonal na progressão da EM, a pesquisa de marcadores que possam detectar este dano precocemente tem sido a grande motivação de muitos pesquisadores. A proteína Tau é uma proteína encontrada nos axônios dos neurônios e tem como principal função manter a estabilidade dos microtúbulos envolvidos no transporte axonal de constituintes sinápticos. Após o dano neuronal, esta proteína é liberada para dentro do espaço extracelular e pode ser detectada no LCR (177). Vários trabalhos demonstraram o aumento dos níveis de proteína Tau no LCR de pacientes com EM comparados com controles normais (178,179,180,181,182,183,184,185). Estas evidências indicam a proteína

Tau como potencial marcador bioquímico de avaliação da lesão axonal in vivo. Alguns autores mostraram que os níveis de Tau no LCR podem estar correlacionados com a síntese intratecal de IgG e com a presença de lesões Gd⁺ na IRM, apoiando a hipótese que a inflamação pode ser, pelo menos em parte, responsável pelo dano axonal observado na EM (180,182). Contudo, alguns trabalhos demonstraram resultados conflitantes, sugerindo que a proteína Tau não é um bom marcador para uso clínico de rotina (186,187,188). Trabalho recente sugere que a combinação dos níveis de N-acetil-aspartato (NAA) e neurofilamentos no LCR pode trazer informações mais relevantes das diferentes fases da patologia axonal. Estes marcadores não mostraram diferenças significativas nos estágios iniciais da EM, mas apresentaram alterações (diminuição do NAA e aumento dos neurofilamentos no LCR) na progressão da doença (189).

O SNC possui uma grande reserva funcional e o aparecimento dos déficits permanentes parece coincidir com a exaustão dos mecanismos compensatórios, como a neuroplasticidade e remielinização. Estudos realizados em modelo animal da EAE demonstraram o envolvimento das lesões axonais e os fenômenos de plasticidade sináptica no desenvolvimento dos sinais clínicos da doença. Os mecanismos de plasticidade sináptica na medula espinhal parecem explicar, pelo menos em parte, a recuperação dos sintomas sensitivos e motores dos animais após tetraplegia (190,191). Alguns autores demonstraram que o tratamento com acetato de glatirâmer pode afetar as alterações sinápticas induzidas durante a exacerbação da EAE. Estes dados indicam que o acetato de glatirâmer exerce uma influência na estabilidade dos terminais nervosos da medula espinhal, contribuindo para seu efeito neuroprotetor durante o curso da esclerose múltipla (192,193). A utilização de métodos funcionais por ressonância magnética (IRMf) permite verificar se estes mecanismos de reorganização funcional estão ocorrendo durante o curso da doença (194).

Portanto, existe uma grande necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos responsáveis por esta transição e identificação de potenciais marcadores preditores de evolução com o objetivo de facilitar o desenvolvimento de tratamentos neuroprotetores que possam impedir ou retardar a progressão da EM.

1.5- Quadro clínico - classificação

O curso clínico da EM pode ser variável sendo caracterizado por ataques agudos (surtos), disfunção neurológica progressiva ou ambos. Os sintomas resultam da interrupção dos tratos mielinizados e podem envolver um ou mais sistemas funcionais. Os sinais e sintomas mais comuns incluem fraqueza, distúrbio sensorial, neurite óptica, diplopias, instabilidade na marcha e ataxia. Com a evolução da doença podem surgir outros sinais e sintomas como disfunção esfíncteriana, fadiga, sinal de Lhermitte, vertigens, dor, espasmos paroxísticos, depressão e declínio cognitivo. A doença se apresenta sob diferentes formas clínicas (195) e os pacientes respondem de forma variável ao tratamento (196), mas não existe um marcador biológico para distingui-las.

A classificação das formas clínicas da EM não inclui parâmetros de RM. Um consenso realizado por especialistas da Sociedade Americana de Esclerose Múltipla (NMSS) estabeleceu uma padronização da terminologia utilizada para a descrição das formas clínicas (197). Os resultados definiram os seguintes cursos clínicos:

Forma remitente-recorrente (EMRR) - doença claramente definida por surtos com remissão completa ou parcial dos sintomas e períodos entre os surtos caracterizados pela ausência de progressão da doença. Esta é a forma clínica mais freqüente (cerca de 2/3 dos casos de EM) que, em determinada fase da doença, pode evoluir para a forma progressiva secundária (195).

Forma progressiva primária (EMPP) - doença com evolução progressiva desde o início dos sintomas com ocasionais períodos permitidos de estabilidade e melhora. O elemento essencial é a perda gradual das funções com flutuações do quadro clínico, mas sem o aparecimento de surtos.

Forma progressiva secundária (EMPS) - doença com a forma remitente-recorrente no início, seguida pela progressão dos sinais e sintomas com ou sem ocasionais surtos, remissões ou pequenos períodos de estabilidade.

Forma progressiva com surtos (EMPR) - doença com evolução progressiva desde o início com claros períodos de exacerbação agudos, com ou sem remissão dos sintomas. Os períodos entre os surtos são caracterizados pelo contínuo declínio das funções comprometidas.

Além destas formas clínicas, o consenso estabeleceu dois subtipos clínicos especiais de evolução:

Forma Benigna - todas as funções estão totalmente preservadas em todos os sistemas funcionais neurológicos após 15 anos do início da doença. A definição de curso benigno ficou mais uniforme entre os pesquisadores quando Kurtzke introduziu a escala de incapacidade (EDSS) (28). Na literatura, para ser considerado curso benigno, os escores de incapacidade devem ficar de 0 a 2 (198), de 0 a 4 (199) e com uma variação na duração da doença de 5 (200) a 15 anos (201). Contudo, o ponto de corte mais usado é um escore ≤ 3.0 , depois de uma duração de no mínimo 10 anos (202).

Forma maligna - doença com curso clínico rapidamente progressivo que leva a um importante grau de incapacidade em múltiplos sistemas, ou morte em um curto espaço de tempo do início da doença.

Esta classificação permitiu a uniformidade das descrições clínicas entre os diferentes pesquisadores, sendo muito utilizada internacionalmente em todos os estudos multicêntricos. Ela define a forma clássica da EM, mas são descritas outras síndromes desmielinizantes (variantes) menos frequentes que possuem substrato patológico inflamatório semelhante. Estas síndromes diferem da forma clássica com eventual apresentação clínica grave, restritas a determinadas topografias (nervo óptico e medula espinhal) e com características patológicas diferentes (destruição axonal aguda e necrose nas variantes de Balo e Marburg).

1.6- Patologia

O marcador patológico da EM é a placa na substância branca que se caracteriza por uma área de desmielinização e relativa preservação de axônios. A desmielinização na EM ocorre de forma disseminada, bilateral e irregular, e sua topografia determina a clínica. As placas se distribuem em relação às veias e às paredes ventriculares e na medula junto às meninges. A localização preferencial ocorre no epêndima dos ventrículos laterais, no corpo caloso, assoalho do quarto ventrículo, braços da ponte, medula cervical e nervos ópticos.

Podem, eventualmente, localizar-se na transição córtex/substância branca e raramente nos núcleos da base.

As placas podem ser definidas como ativas ou inativas (203). Histologicamente, as lesões ativas apresentam infiltrado linfocitário (células T auto-reativas) perivenular e fagocitose da mielina por macrófagos. Os macrófagos e os linfócitos T invadem o parênquima, enquanto as células B e plasmócitos se concentram na região perivascular. Posteriormente, o infiltrado inflamatório desaparece e os axônios esboçam remielinização e gliose.

Diversos estudos, utilizando biópsias e autópsias do SNC, foram conduzidos no sentido de estabelecer padrões nas lesões desmielinizantes. Lucchinetti e colaboradores (204) estudando tecido do SNC de pacientes com diagnóstico precoce de EM encontraram quatro padrões diferentes de lesões com base na perda da mielina, topografia e extensão das placas, padrão de destruição do oligodendrócito e evidências imunopatológicas da ativação do complemento. Os padrões I e II mostram semelhanças com a encefalomielite autoimune mediada por células T, predominando macrófagos e células T nas placas perivenulares; o padrão II é distinguido pela presença de anticorpos (primariamente IgG) e complemento ativado nas regiões de destruição ativa da mielina. Os padrões III e IV são sugestivos de distrofia primária do oligodendrócito induzida por vírus ou toxina; as lesões do padrão III são caracterizadas também por infiltrado celular, ausência de depósitos de anticorpos e complemento, preferência pela destruição de MAG, comparado com outras proteínas da mielina, perda grave de oligodendrócitos e evidência de apoptose do oligodendrócito; as lesões do padrão IV se distinguem pela morte não apoptótica do oligodendrócito nas áreas de substância branca aparentemente normal ao redor das placas e perda de todos os tipos de proteínas da mielina nas bordas ativas das placas. A remielinização é mínima nos padrões III e IV e acredita-se que as lesões são decorrentes de dano primário do oligodendrócito (205). Os autores demonstraram que os padrões de desmielinização são heterogêneos entre os pacientes, porém homogêneos nas lesões múltiplas ativas do mesmo paciente (204).

Outro estudo realizado em pacientes com EM aguda não demonstrou heterogeneidade (206). Neste estudo, as lesões agudas apresentaram produtos de ativação de complemento e evidências de apoptose dos oligodendrócitos. Por outro lado, as lesões

subagudas, nos mesmos pacientes, apresentaram produtos de ativação do complemento sem evidência de apoptose dos oligodendrócitos. Estes autores sugeriram que as lesões com apoptose dos oligodendrócitos podem ocorrer nos estágios iniciais de formação da lesão e que a heterogeneidade pode representar estágios diferentes de formação da lesão na EM.

Recente trabalho realizado com tecido cerebral de pacientes com EM estabelecida, obtidos de um banco de cérebro, mostrou homogeneidade nas características imunopatológicas das lesões desmielinizantes ativas (207). A identificação das lesões para realização dos cortes histológicos foi auxiliada por IRM. Os autores mostraram que a heterogeneidade, presente nas lesões precoces das lesões desmielinizantes, pode desaparecer na evolução e convergir para um mecanismo geral de desmielinização. Este estudo concluiu baseado na presença persistente de complemento, anticorpos e receptores Fcγ em macrófagos, que o mecanismo dominante de desmielinização na EM estabelecida é a fagocitose da mielina mediada por anticorpos e complemento.

Na fase crônica da EM, as placas são pouco ativas. As placas crônicas apresentam uma resposta inflamatória menor com poucos linfócitos, perda da mielina e diferentes graus de dano axonal (208,209). Os oligodendrócitos estão ausentes ou em pequena quantidade, mas podem estar presentes células precursoras dos oligodendrócitos (210). Algumas áreas de remielinização podem ocorrer em placas agudas ou crônicas e são denominadas *shadow plaques*.

Apesar da EM ser considerada uma doença da substância branca, as lesões podem ocorrer em todo o parênquima do SNC, incluindo córtex cerebral e substância cinzenta profunda. Estudos imunohistoquímicos demonstraram extensas áreas de desmielinização na fase crônica da EM (211).

1.7- Diagnóstico

O diagnóstico da EM é clínico e caracterizado pela demonstração de disfunção disseminada da substância branca no tempo e no espaço (212). Dois ou mais surtos com evidência clínica objetiva de duas ou mais lesões definem o diagnóstico clínico da EM, sem

a necessidade de testes paraclínicos. Em cerca de 90% dos pacientes com EM, a primeira manifestação é aguda e os sinais e sintomas indicam lesões na medula espinal (50%), nervo óptico (25%) ou tronco cerebral (15%). Contudo, estas síndromes podem ter causas diferentes e nem todos os pacientes evoluem para o diagnóstico de EM.

Em 1983, este critério clássico foi aprimorado por um comitê da sociedade americana de esclerose múltipla, liderado por Poser (213). Estes critérios incluíram as seguintes categorias: esclerose múltipla clinicamente definida, esclerose múltipla definida laboratorialmente, esclerose múltipla provável (apoio clínico ou laboratorial) e esclerose múltipla possível. A presença de banda oligoclonal IgG (BO) ou evidência de síntese intratecal de imunoglobulinas IgG é pré-requisito para o diagnóstico de EM definida pelo laboratório.

As informações obtidas pela anamnese, exame neurológico e outros testes paraclínicos (ressonância magnética, líquido cefalorraquiano, potenciais evocados e testes laboratoriais sanguíneos) são fundamentais para exclusão de outras patologias que melhor expliquem os sinais e sintomas da síndrome clínica. A ausência de marcadores biológicos ou clínicos patognomônicos da doença impõe um diagnóstico de exclusão.

A utilização do exame do Líquido Cefalorraquiano (LCR) no diagnóstico da EM foi bem definida em consenso publicado por um grupo de pesquisadores da Fundação de Charcot (214). O consenso estabeleceu como teste essencial a pesquisa de bandas oligoclonais IgG no LCR pelo método da focalização isoelétrica que está presente em mais de 95% dos pacientes com a forma clínica remitente-recorrente (EMRR); os testes complementares incluem o quociente albumina (avaliação da função da barreira hemato-LCR), o índice IgG (avaliação quantitativa da síntese intratecal de IgG) e a contagem global de células no LCR. Um estudo brasileiro utilizou estes parâmetros laboratoriais para determinar o perfil do LCR em pacientes com o diagnóstico de EM clinicamente definida. A média da contagem global de células foi menor do que 35 células/mm³ em 97% casos, síntese intratecal de IgG por métodos quantitativos em 53% e bandas oligoclonais IgG em 85% dos casos (215). Em outro estudo, aspectos clínicos foram comparados com os achados do LCR em pacientes brasileiros. Os pacientes com a forma progressiva apresentaram índice IgG sugestivo de imunoliberação intratecal em 76% dos

casos, na fase de surto em 46% e durante a remissão em 49% (216). Estes dados contribuíram para demonstrar as variações e flutuações da resposta imunológica nos diferentes estágios clínicos da EM.

A IRM é um teste paraclínico fundamental para o diagnóstico precoce da EM e alguns autores sugerem a visualização de um número mínimo de nove lesões em T2 para aumentar a especificidade. Uma avaliação de critérios por IRM, derivados de imagens em T2 e captação de gadolínio em T1, identificou como fatores preditivos para a doença, lesões justacorticais, infratentoriais, periventriculares e captantes de gadolínio. Estes autores concluíram que o número, o tipo e a localização das lesões são essenciais na aplicação dos critérios diagnósticos da EM (217).

Após análise de vários estudos, um novo comitê estabelecido pela sociedade americana de esclerose múltipla (NMSS) liderado por Mc Donald (218) elaborou novos critérios acrescentando diretrizes diagnósticas por IRM (217,219). Esta nova revisão incluiu as formas monossintomáticas no diagnóstico da EM. Neste consenso internacional, as diretrizes recomendadas para o diagnóstico da EM foram as seguintes:

(1) O diagnóstico de EM requer evidência objetiva de disseminação das lesões no tempo e no espaço.

(2) Os achados da IRM podem contribuir para a determinação da disseminação no tempo ou espaço.

(3) Outros testes (LCR e potenciais evocados) podem apoiar o diagnóstico.

(4) As categorias foram definidas como EM possível, EM ou não EM.

Em 2005, os critérios foram novamente revisados (220) com o objetivo de simplificar e permitir o diagnóstico precoce da EM, mantendo uma adequada sensibilidade e especificidade.

Estes critérios definiram para caracterização da disseminação no espaço (217,219) a presença de pelo menos três das seguintes situações:

(1) No mínimo uma lesão Gd+ ou nove lesões em T2 (lesão na medula espinhal pode ser incluída).

(2) No mínimo uma lesão infratentorial (lesão na medula espinhal é considerada infratentorial).

(3) No mínimo uma lesão justacortical.

(4) No mínimo três lesões periventriculares.

A determinação da disseminação no tempo pode ocorrer de dois modos:

(1) Detecção de lesão GD+ no mínimo três meses após o evento inicial (o sítio de lesão não pode ser o mesmo do evento inicial).

(2) Detecção de uma nova lesão em T2, comparada com a imagem anterior, no mínimo 30 dias após o evento clínico inicial.

O diagnóstico da forma progressiva primária (EMPP) é mais difícil. O critério original de McDonald (218) para o diagnóstico da EMPP foi baseado nos trabalhos de Thompson e colaboradores (221). Após a revisão de 2005 (220), o diagnóstico pode ser definido na ausência de LCR positivo, mas com presença de alterações típicas na IRM. As recomendações atuais determinam para o diagnóstico da EMPP os seguintes requisitos:

(1) Um ano de progressão da doença.

(2) E, no mínimo, duas das seguintes situações: (a) IRM cerebral positiva (nove lesões em T2 ou quatro ou mais com potencial evocado visual positivo); (b) IRM medula espinhal positiva (duas lesões em T2); (c) LCR positivo (bandas oligoclonais IgG pela focalização isoeletrica ou aumento do índice IgG, ou ambos).

Em resumo, os critérios atuais para o diagnóstico de EM foram definidos para aumentar a especificidade do diagnóstico, facilitar o diagnóstico precoce e minimizar o número de falsos diagnósticos. Para isto, o consenso internacional de 2005 recomendou a utilização de critérios clínicos e paraclínicos (IRM, PEV e LCR). Estas recomendações

incluiram rigorosas diretrizes pela IRM, mas não sistematizaram a análise do LCR. A análise do LCR é fundamental para o diagnóstico diferencial. Quando os testes paraclínicos são normais, isto pode indicar uma forte sugestão de um diagnóstico alternativo. Por outro lado, um teste anormal apóia o diagnóstico. Assim, há uma grande necessidade da utilização dos testes mais sensíveis e específicos. Em 2005, outro consenso internacional, formado por especialistas na análise do LCR e liderado por Freedman, publicou as diretrizes para a avaliação do LCR na EM (222). Este comitê definiu a pesquisa de bandas oligoclonais IgG pelo método da focalização isoelétrica seguida de imunofixação, como padrão ouro para o diagnóstico da EM pelo LCR.

Apesar das novas diretrizes (220,222), os autores reconhecem que os métodos paraclínicos são mais aplicáveis nos locais onde os testes estão facilmente disponíveis. Na ausência destas facilidades, o diagnóstico de EM pode ser feito utilizando somente os critérios clínicos.

1.8- Imagem por ressonância magnética na EM

A IRM é o teste paraclínico mais sensível para detectar lesões e demonstra anormalidades aproximadamente em 95% dos pacientes EM (223). As placas de desmielinização podem estar em estágios diferentes de evolução. Nas lesões ativas com componentes inflamatórios pode ocorrer impregnação de contraste (gadolinio +) devido, principalmente, à liberação de fatores teciduais dos macrófagos (224). A interpretação de focos incidentais de hipersinal em T2 e DP (periventriculares) pode ser causa de falso diagnóstico de EM. A presença de anormalidades nas imagens ponderadas em T2 mostra alta sensibilidade para lesões da EM, porém a especificidade é baixa (225). As imagens características da doença são áreas brilhantes (seqüências de TR longo com hipossinal em T1 menos marcado na substância branca profunda periventricular) de configuração triangular com base no epêndima, conferindo aspectos de labaredas nas coroas radiadas nos cortes sagitais. Em 93% dos casos, pequenos focos de lesão ocorrem na face inferior da porção mediana interhemisférica do corpo caloso. A presença de placas em outras

localizações é inespecífica (226). Lesões justacorticais detectadas pela IRM foram associadas com sintomas depressivos, declínio cognitivo e epilepsia (227,228,229,230,231).

A IRM é bastante utilizada na avaliação das alterações patológicas que ocorrem no início e na progressão da EM. As imagens obtidas pelos métodos convencionais de IRM (T1 e T2) são muito úteis para o diagnóstico, mas revelam de forma incompleta o grau de inflamação e neurodegeneração desta doença. O hipersinal em T2 (inespecífico) está presente nas lesões com edema, desmielinização, gliose e perda axonal. Imagens hipo-intensas em T1 sem contraste podem revelar áreas de neurodegeneração denominadas buracos negros (*black holes*). Autores sugerem que a carga total de lesões pode ser um indicador do estado da doença e um marcador alternativo de eficácia do tratamento (232).

Técnicas de IRM avançadas não convencionais são capazes de detectar lesões e anormalidades sutis em substância branca aparentemente normal pela espectroscopia (233,234,235), atrofia cerebral (236), desconexão de tratos da substância branca medidos pela tensão de difusão (237), evidências de plasticidade e alteração na conectividade pela IRM funcional (238).

A Transferência de Magnetização (MTI) e a Difusão (DWI) superam as limitações das técnicas convencionais (239). A MTI é baseada nas interações entre prótons livres e aqueles com restrição à movimentação (moléculas de água ligadas às macromoléculas) (240). O contraste é obtido através de uma aplicação seletiva de irradiação dos prótons (*off-resonance irradiation*) por um pulso de radiofrequência centrado na frequência de água livre. Esta irradiação satura o nível de energia dos prótons imóveis produzindo uma perda de intensidade de sinal que pode ser medida como uma taxa de transferência de magnetização (MTR), relacionada com a quantidade de prótons em um dado tecido. No cérebro, a matriz macromolecular consiste de mielina e de outras membranas celulares. As lesões por edema levam ao aumento dos valores da MTR. A diminuição da MTR indica uma capacidade reduzida das macromoléculas para trocas com moléculas de água livre nas lesões cerebrais, sugestiva de desmielinização e perda axonal (234,241). Trabalhos em autópsias e experimentos com animais também mostraram que a diminuição da MTR correlaciona-se com achados histopatológicos de destruição da mielina e dano axonal (242). O método da difusão (DWI) promove uma forma de contraste que

permite a medida da difusão de moléculas de água e, como consequência, a interação entre a água dos tecidos e as estruturas celulares. Além disso, DWI fornece dados sobre orientação, tamanho e geometria das estruturas cerebrais (243). As estruturas celulares cerebrais restringem a movimentação da água e, portanto, os processos patológicos que modificam a integridade tecidual removendo algumas barreiras restritivas podem resultar em um aumento do coeficiente de difusão (244). Estudos preliminares em pacientes com EM através da DWI mostraram que o coeficiente de difusão nas lesões macroscópicas é maior do que nas lesões com substância branca aparentemente normal (245).

Outros estudos demonstraram que o valor da IRM pode ser maior quando combinado com a espectroscopia (MRS) (246). A espectroscopia de cérebros normais mostra picos atribuídos ao N-acetil-aspartato (NAA), creatina e fosfocreatina (Cr) e componentes contendo colina (Cho). A concentração relativa destes metabólitos, vistos na MRS, depende da patologia local. Alguns autores acreditam que as placas crônicas mostram uma redução no pico do NAA que pode indicar um dano neuronal/axonal (247). As placas agudas exibem uma elevação do pico da colina associada com inflamação celular (248). Uma das mais interessantes observações na MRS é o aparecimento de picos 0,8 a 1,5 ppm de algumas lesões (249). Estes picos são atribuíveis, principalmente, aos lipídeos; a espectroscopia de tecido neural normal exhibe fracos picos lipídicos. A presença de fortes picos lipídicos em algumas lesões de EM estão sendo interpretados como derivados de quebra de produtos da mielina associados com a desmielinização ativa (250). Esta interpretação é apoiada por estudos experimentais com EAE (251).

Estes métodos avançados *in vivo* avaliam melhor a deterioração do quadro clínico (progressão e agravamento da incapacidade), apóiam o conceito de que a perda axonal e neuronal é responsável pela disfunção permanente que ocorre nos pacientes com EM e têm um grande potencial para detectar efeitos neuroprotetores do tratamento (252).

1.9- Tratamento

O tratamento da EM envolve aspectos da doença de base (tratamento dos surtos, prevenção dos surtos e prevenção da progressão) e efeitos da doença (tratamento dos sintomas e medidas de suporte). Não existem ainda intervenções terapêuticas eficazes para

a prevenção completa dos surtos na EM, embora reduzam a sua frequência, gravidade e, provavelmente, os déficits funcionais acumulados. Os estudos com os glicocorticóides na EM mostraram um efeito na recuperação mais rápida das funções comprometidas nos surtos agudos da doença. Os corticosteróides são recomendados no tratamento dos surtos, mas nenhum benefício funcional no longo prazo foi demonstrado. Algumas estratégias terapêuticas (imunossuppressores e quimioterápicos) conferem modesto benefício e um dos problemas é a toxicidade. Os agentes terapêuticos (ciclofosfamida, azatioprina, ciclosporina, cladribina, metotrexate, mitoxantrona e imunoglobulina), freqüentemente utilizados na prática clínica, fazem parte da lista de medicamentos recomendados no Brasil e pelo comitê da Academia Americana de Neurologia, que publicou as diretrizes do tratamento da Esclerose Múltipla em consenso realizado em 2001 (253,254).

A introdução das drogas modificadoras do curso da doença produziu claramente um impacto favorável no tratamento da EM. Vários ensaios clínicos controlados demonstraram a eficácia e tolerabilidade destas drogas. Atualmente, as drogas modificadoras aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) são: beta-interferona (IFN), acetato de glatirâmer, natalizumabe (anticorpo monoclonal) e a mitoxantrona (agente quimioterápico) (255). Há fortes evidências da ação destas drogas na atividade da doença, mas o impacto na progressão da doença ainda não está claro (256).

O uso das interferonas na EM têm sido estudado há mais de 20 anos. Os mecanismos de ação envolvem a regulação da apresentação do antígeno via moléculas coestimulatórias, limitação da migração dos linfócitos T para dentro do SNC pelos efeitos nas metaloproteinases e moléculas de adesão, além de reduzir a permeabilidade da barreira hemato-encefálica. O acetato de glatirâmer (copolímero) é um oligopeptídeo que mostrou efeito imunomodulador no modelo da EAE (257). O mecanismo de ação exato é desconhecido, mas a droga foi testada em pacientes com EMRR reduzindo a taxa anual de surtos em 30% (258). Um dos mecanismos de ação parece envolver a ativação de células Th2 que atravessam a barreira hemato-encefálica e secretam citocinas supressoras da atividade inflamatória. A droga é bem tolerada e há algumas evidências de benefício no grau de incapacidade dos pacientes (259). Beta-Interferona 1b, beta-interferona 1a e acetato de glatirâmer estão disponíveis no mercado brasileiro e foram aprovados pela Secretaria

Nacional de Saúde. Trabalhos recentes sugerem que a eficácia das interferonas e do acetato de glatirâmer parece ser semelhante.

Como a monoterapia com imunomodulador não é totalmente eficaz, novas alternativas de tratamento são necessárias. Algumas estratégias para combinação de drogas estão sendo testadas como a adição de imunossupressor. Há evidências de efeitos sinérgicos da associação entre beta-interferona, acetato de glatirâmer e novos agentes em teste clínico (260). Outra forma de ampliar o efeito terapêutico é realizar uma indução com mitoxantrona antes de iniciar o imunomodulador (261).

Alguns estudos têm mostrado que o início precoce do tratamento parece ter um papel significativo na evolução clínica destes pacientes (259,262,263,264,265). Pesquisadores contrários ao tratamento precoce argumentam que determinados pacientes irão apresentar formas benignas da doença e não seria racional submetê-los a efeitos colaterais indesejáveis sem uma real necessidade.

Apesar do uso dos imunomoduladores, uma grande parte dos pacientes EM evolui com perda de funções neurológicas e incapacidade permanente. Alguns agentes terapêuticos podem ser utilizados para diminuir os efeitos das sequelas e proporcionar uma melhor qualidade de vida para estes pacientes. Além disso, os avanços nos métodos de reabilitação cognitiva e fisioterapia podem gerar grandes resultados positivos, principalmente, quando realizados em um contexto multidisciplinar (266).

Várias drogas orais estão em fase de teste clínico como FTY720 (fingolimode) (267), ácido fumárico (268), cladribina (269), teriflunomida (270) e as estatinas (271).

Os anticorpos monoclonais fazem parte de um grupo seletivo de agentes que atuam através da ligação com moléculas específicas na superfície de células alvo, como células T ou células B. Existem alguns anticorpos monoclonais (natalizumabe, alemtuzumabe, rituximabe e daclizumabe), aprovados ou em teste clínicos, que são dirigidos contra estes alvos e considerados entre os mais promissores agentes terapêuticos (272).

Além da imunoterapia inespecífica, foi testada a terapia específica utilizando componentes da mielina no sentido de reduzir os danos das reações auto-imunes. O tratamento de pacientes portadores de esclerose múltipla com proteína básica de mielina oralmente, resultou no aparecimento de linfócitos com padrão Th3 que secretam altos níveis de TGF β e IL-10 (273). Como a doença é muito heterogênea e não existem marcadores prognósticos, uma grande dificuldade na aplicação dos novos agentes terapêuticos é observada. Os novos agentes, em fase de teste clínico, visam modificar o curso clínico, estimulando a neuroproteção e reparação. Uma melhor definição dos subtipos de EM e a identificação de marcadores de resposta ao tratamento irão facilitar muito a individualização do tratamento específico.

1.10- Prognóstico

Os estudos prévios de história natural e fatores prognósticos usaram a escala EDSS para avaliar o grau de incapacidade acumulado ao longo do curso da EM (28). EDSS é uma escala de medida da incapacidade ambulatorial, mas não possui boa sensibilidade para avaliar declínio cognitivo. Vários fatores estão relacionados ao tempo mais curto que determinados pacientes levam para atingir níveis de incapacidade elevados ($EDSS \geq 6$): sexo masculino; idade de início (>40); sintomas motores, cerebelares ou esfinterianos no início da apresentação; doença multifocal no início; surtos frequentes nos primeiros cinco anos; curto intervalo entre o primeiro e o segundo surto; curto espaço de tempo para atingir a EDSS 4; e curso progressivo (274). O escore da EDSS no quinto ano de doença apresenta uma boa correlação com a evolução no longo prazo, mas parece que todos os fatores determinantes de progressão ou incapacidade atuam somente até o nível de EDSS 4. Após este nível, o curso é independente dos fatores preditores na linha de base. Contudo, alguns casos definidos como benignos podem desenvolver curso progressivo (275).

O objetivo do tratamento é prevenir ou adiar a incapacidade do paciente pela doença. Contudo, as lesões definitivas e incapacitantes podem levar muitos anos para ocorrer e, portanto, medidas de atividade são importantes para a correlação do estado atual do paciente e o seu prognóstico futuro.

A IRM e a análise do LCR são freqüentemente utilizadas para ajudar no diagnóstico e prognóstico do curso da EM (276). A IRM auxilia a monitorização do curso da EM através da detecção dos sinais de atividade da doença (lesões Gd+ ou aparecimento de novas lesões). Estes achados são dez vezes maiores que os achados clínicos medidos pela taxa de surtos ou progressão (277).

No entanto, estudos preliminares que correlacionaram incapacidade clínica e carga total de lesões (VTL) foram inconclusivos. O número ou volume de lesões em T2 não apresentaram uma correlação significativa com a gravidade da doença (278). O mesmo ocorreu com a carga de lesões (número de placas e volume total de lesões) Gd+ que mostrou um fraco valor preditivo para taxa de surtos e nenhum valor para a evolução da desordem clínica (279). Atualmente, a IRM convencional oferece informações prognósticas do curso clínico somente nos estágios iniciais da doença. Nas síndromes clínicas isoladas, por exemplo, o número de lesões em T2 é preditivo de desenvolvimento de EM clinicamente definida. Este valor preditivo é maior se o número de lesões na IRM for combinado com os achados do LCR. Alguns autores demonstraram a correlação do número de lesões em T2 e a EDSS com os níveis de proteína Tau no LCR (181,280).

O estudo do volume de lesões hipointensas em T1 mostrou maior correlação positiva com a incapacidade clínica do que a carga de lesões em T2 (281). A disfunção cognitiva parece ter uma boa correlação com o volume de lesões cerebrais (282). Uma outra escala funcional (MSFC) foi proposta para as avaliações clínicas e cognitivas (283). Além de detectar o declínio cognitivo, a MSFC apresentou melhor correlação com o volume de lesões (hipointensas em T1 e hiperintensas em T2) e volume cerebral na IRM (284,285). As lesões hipointensas em T1, grau de atrofia e redução do NAA, são interpretadas como perda axonal que pode levar à incapacidade clínica permanente.

Por outro lado, a composição estrutural, celular e molecular das lesões na EM são bastante complexas. Os achados de desmielinização, inflamação, perda axonal e gliose podem ser utilizados para definir o estágio de desenvolvimento das lesões. A maioria das lesões na EM são hiperintensas em T2, principalmente com o uso da técnica de FLAIR (286). Qualquer tipo de destruição tecidual ou lesão que provoque acúmulo de água produz hipersinal em T2, que mostra a baixa especificidade patológica destas alterações. Muitas

lesões hiperintensas em T2 são hipointensas em T1 e refletem uma expansão do espaço extracelular, destruição celular ou aumento do conteúdo de água pela quebra de barreira hemato-encefálica (287). Nos estágios iniciais das lesões ocorre realce com gadolínio após a invasão dos macrófagos. Isto permite concluir que não existe uma correlação estrita das lesões hipointensas com perda axonal em qualquer estágio de desenvolvimento das lesões (288). A atrofia cerebral que ocorre nos pacientes com EM pode ser resultado de perda axonal dentro das lesões e secundária a degeneração Walleriana fora das lesões. Evidências indiretas sugerem que a atrofia cerebral global se desenvolve fora das lesões e também na presença de poucas lesões (289). Estes dados estão de acordo com os achados de espectroscopia que mostraram diminuição dos níveis de NAA em substância branca aparentemente normal (290).

Um aspecto fundamental na compreensão dos fatores envolvidos no prognóstico clínico dos pacientes com EM é a correlação da patologia com potenciais marcadores biológicos do LCR, sangue periférico e IRM, assim como o seu comportamento diante dos imunoterápicos empregados no tratamento.

2- OBJETIVOS



2.1- Objetivos gerais

Esse trabalho teve como proposta correlacionar os parâmetros clínicos e dados obtidos pela IRM quantitativa com o perfil da resposta inflamatória no LCR e soro. Foi avaliado ainda o efeito do tratamento com imunomodulador na evolução clínica dos pacientes.

2.2- Objetivos específicos

1. Dosagem dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias no LCR e soro.
2. Análise qualitativa e quantitativa das lesões na ressonância magnética de crânio: presença de lesões captantes de gadolínio (Gd+), volume total das lesões cerebrais (VTL), volume cerebral - medida de atrofia cerebral (VC).
3. Estudo da síntese intratecal de anticorpos no LCR: Índice IgG-síntese intratecal de IgG; Pesquisa de bandas oligoclonais IgG; Índice IgM-síntese intratecal de IgM.
4. Dosagem das proteínas T-tau e P-tau no LCR.
5. Pesquisa de anticorpos para Epstein-Barr vírus IgG e IgM no LCR.

3- METODOLOGIA



3.1- Pacientes

Pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla (EM) clinicamente definida foram acompanhados no ambulatório de neurologia da UNICAMP entre 1997 e 2007. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética desta instituição e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes. Os pacientes foram recrutados durante a investigação diagnóstica em visitas sequenciais.

Durante o período de 2002 a 2004, 58 indivíduos foram recrutados para um estudo preliminar. Os indivíduos foram divididos em quatro grupos:

I. 23 pacientes com esclerose múltipla com a forma clínica remitente-recorrente (EMRR) durante remissão clínica (seis homens e dezessete mulheres, média de idade de 30 anos).

II. 16 pacientes com outras doenças neurológicas (ODN) (três homens e treze mulheres, média de idade de 33 anos): quatro com doença do neurônio motor, dois com neuropatia hereditária sensitivo-motora, dois com doença de Parkinson, quatro com epilepsia, dois com demência de Alzheimer, dois com doença cerebrovascular.

III. 23 indivíduos (um homem e vinte e duas mulheres, média de idade de 31 anos) com manifestação neurológica associada ao Lupus Eritematoso Sistêmico (LES).

IV. 19 indivíduos (sete homens e doze mulheres, média de idade de 30 anos) com cefaléia sem evidência de doença neurológica orgânica, estudados como grupo controle saudável (CS).

Os testes laboratoriais foram realizados durante o contato inicial com objetivo diagnóstico. Os pacientes estavam em remissão clínica e sem tratamento. O tempo entre o primeiro sintoma da doença e a primeira consulta foi de 4.2 ± 3.8 anos. O escore da EDSS foi determinado no momento da punção lombar. Nenhum dos pacientes tinha recebido corticosteróides ou outras drogas imunossupressoras durante um período mínimo de seis meses antes da coleta das amostras de LCR e sangue. Nestes grupos de pacientes foram avaliados os níveis de citocinas, contagem de leucócitos e síntese intratecal de IgG. Esta

parte do estudo foi realizada exclusivamente na fase de determinação diagnóstica dos pacientes com EM.

Após a avaliação inicial dos 23 pacientes com esclerose múltipla, outros 31 pacientes EMRR foram recrutados. Um total de 54 pacientes (37 mulheres e 17 homens) (EMRR), de acordo com os critérios de Poser (213), foi incluído no estudo. Os testes laboratoriais e a aquisição das imagens por ressonância magnética (IRM) foram realizados na fase de remissão dos sintomas clínicos em todos os pacientes em dois momentos (pontos):

Ponto 1: durante a investigação da doença, antes do início de qualquer tratamento imunomodulador ou imunossupressor.

Ponto 2: após tratamento, com imunomodulador por no mínimo 3 anos.

A escala de incapacidade EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) (28) foi obtida durante as consultas ambulatoriais em todo o seguimento dos pacientes. A taxa de surtos anual foi obtida através da análise dos prontuários durante o seguimento. O grupo controle que realizou exames de imagem foi formado por 20 indivíduos voluntários saudáveis (onze mulheres e nove homens), com idades entre 20 e 62 anos (média de 32 anos). Eles foram recrutados da comunidade local e não tinham história familiar de doenças neurológicas ou psiquiátricas. Foram excluídos pacientes com comorbidades significativas, como alcoolismo, trauma de crânio, hipertensão arterial, diabetes mellitus, acidente vascular, abuso de drogas e doenças malignas.

3.2- Amostras de LCR e Soro

Todas as amostras foram obtidas após a primeira consulta para rotina de contagem de leucócitos no LCR, síntese intratecal de IgG e pesquisa de bandas oligoclonais IgG. As amostras (LCR e soro) foram armazenadas em tubos de polipropileno e estocadas a -80° C até a realização dos ensaios propostos. O LCR (10 ml) foi retirado e a contagem de células foi determinada imediatamente antes da estocagem.

3.3- Procedimentos laboratoriais – estudo do LCR

A contagem global dos leucócitos foi feita na câmara de Fuchs-Rosenthal. A nefelometria foi utilizada para determinação quantitativa das imunoglobulinas e albumina no LCR e no soro (BN II; Dade Behring, Marburg, Germany), que é uma reação de imunoprecipitação específica entre a proteína (antígeno) e o anticorpo; o complexo antígeno-anticorpo emite sinais luminosos que são convertidos em valores de proteína específica (291).

Avaliação da Barreira hemato-LCR:

Quociente Albumina (Qalb)= albumina lcr / albumina soro

(valor referência Qalb < 8×10^{-3}).

O LCR é um produto da filtração do sangue e a barreira hemato-LCR permite a passagem de proteínas de acordo com seu peso (tamanho) molecular. A albumina não é sintetizada no SNC e, portanto, toda a albumina encontrada no LCR é proveniente do soro. O Qalb tem sido utilizado como parâmetro de função da barreira hemato-LCR (292).

Síntese intratecal de anticorpos: Índice IgG e Índice IgM foram calculados conforme publicações prévias (291,292,293,294,295):

Quociente IgG= IgGLCR/ IgGsoro

Índice IgG = QIgG/ Qalb (valor referência Índice IgG < 0.7)

Quociente IgM= IgMLCR/ IgMsoro

Índice IgM= QIgM/ Qalb (valor de referência Índice IgM < 0.068)

Bandas oligoclonais IgG

A detecção de bandas oligoclonais foi realizada através da focalização isoeletrica que é o método mais sensível para comprovação da síntese intratecal de IgG (215).

Antígeno, anticorpo e citocinas recombinantes

IL 12, IFN γ , TNF α e IL 10 foram quantificadas usando testes comerciais específicos (PharMingen, San Diego, CA) (Biosource International, Nivelles, Belgium). Brevemente, as microplacas (Immulon I, Nunc, Roskilde, Denmark) foram cobertas com 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do anticorpo de captura de cada citocina em 0,1 M NaHCO₃ (pH= 8.5) e incubadas por 18 h a 4° C. Após este período de incubação, para evitar possíveis reações inespecíficas, as microplacas foram incubadas com 2% de BSA em PBS. Após as devidas lavagens, as amostras e os padrões de citocinas IFN γ , TNF α , IL10 e IL12 foram adicionados e as microplacas foram incubadas a 4° C por 24 h. A seguir, 0.5 – 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticorpos monoclonais biotinilados específicos para a detecção de IFN γ , TNF α , IL10 e IL12 foram adicionados e incubados por 1 h em temperatura ambiente. Após as lavagens foram adicionados 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ de avidina-peroxidase na concentração de 1: 400 (Sigma Chem, USA). As microplacas foram lavadas por seis vezes e 100 $\mu\text{l}/\text{poço}$ de substrato foi adicionado. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente, as microplacas foram lidas em Leitor de ELISA (Labsystem) a 492 nm. As curvas padrões foram feitas e as concentrações das diferentes amostras calculadas em picogramas/ ml. Todas as análises foram realizadas no mesmo momento para minimizar variabilidade intra-ensaio.

Anticorpos IgG e IgM para Epstein-Barr vírus (EBV)

Foram utilizados kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) para a determinação semi-quantitativa do anticorpo IgG anti-EBNA, IgG e IgM VCA para o vírus Epstein-Barr (EBV) no LCR (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany).

Quantificação das proteínas T-tau e P-tau

As análises foram realizadas através dos kits INNOTEST^R h TAU Ag e INNOTEST^R PHOSPHO-TAU_(181P) (Innogenetics, Gent, Belgium) (gentilmente cedidos pela TEVA Farmacêutica Ltda), conforme descritos previamente (296,297,298,299,300,301,302). Estes testes são ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em que as proteínas (T-Tau e P-tau) são capturadas por anticorpos monoclonais específicos.

3.4- Neuroimagem

As imagens da ressonância magnética de crânio (IRM) foram obtidas através de um Sistema de 2.0 Tesla (Elscint, Prestige^R), com aquisições nos planos coronal, sagital e axial, além de aquisição em 3D (volumétrica), para reconstrução multiplanar. Os parâmetros de imagem para as diferentes aquisições foram:

1. Imagens sagitais T1 ponderadas “spin echo” (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,800, TR= 430, TE= 12, matriz de 200x350, FOV= 25x25 cm).
2. Imagens no plano axial (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,800, TR= 550 ms; TE= 12 ms; matriz de 300 x 210).
3. Imagens sagitais T2 ponderadas (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,100, TR= 6,600 ms; TE= 128 ms; matriz de 320 x 252).
4. Imagens no plano axial “double echo”: densidade protônica ponderada (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,700, TR= 4,800 ms; TE= 16 ms; matriz de 256 x 256); T2 ponderada (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,700, TR= 4,800 ms; TE= 128 ms; matriz de 256 x 256); inversion time 2,550.
5. Imagens no plano axial “flair” (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,100, TR= 10,099 ms; TE= 90 ms; matriz de 250 x 250).
6. Imagens coronais T1 ponderadas (espessura de 6 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 1,800, TR= 550 ms; TE= 12 ms; matriz de 270 x 200).
7. Imagens no plano axial T1 ponderadas “gradient echo” (espessura de 3 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 70°, TR= 200 ms; TE= 5 ms; matriz de 180 x 232; FOV, 22 x 22 cm).

8. Imagens no plano axial T1 ponderadas “fast spin-echo” (espessura de 4 mm, ângulo de excitação – “flip angle” – de 120°, TR= 6,800 ms; TE= 129 ms; matriz de 252 x 328; FOV, 21 x 23 cm).
9. Aquisição 3D obtida no plano sagital “gradient echo” T1 ponderadas para reconstrução multiplanar (espessura de 1 mm, ângulo de excitação – “tip angle” – de 35°, TR= 22 ms; TE= 9 ms; matriz de 256 x 220; FOV, 23 x 25 cm). Foi administrado 0.1 mmol/kg de gadolínio-DTPA.

O volume de lesão cerebral total (VTL) e o volume cerebral (VC) foram quantificados através de um programa de segmentação semi-automático (“Neuroline”) (303) desenvolvido no laboratório de neuroimagem da Unicamp. Este é um programa semi-automático elaborado como alternativa à segmentação manual. O operador interage com o sistema definindo marcadores (pontos ou linhas desenhados pelo operador através do sistema semi-automático), parâmetros (pré e pós-processamento) e contornos (segmentação manual em casos onde a inserção de marcadores adicionais não apresenta resultados satisfatórios na obtenção de contornos). Os marcadores são coloridos e cada cor está associada a uma determinada estrutura que se deseja segmentar. O método de segmentação utilizado no sistema é a transformação “Watershed” (304) com marcadores por morfologia matemática, que é baseado nas variações dos níveis de cinza e na localização dos pixels marcados para obtenção dos contornos. A apresentação dos contornos resultantes é muito rápida, pois a segmentação é aplicada apenas no corte onde o marcador foi traçado.

As lesões foram também analisadas em uma plataforma de trabalho através de um método de contagem visual. A localização e a quantificação do número de lesões foram realizadas pelos métodos semi-automático e visual. As imagens em densidade protônica e T2 ponderadas foram quantificadas de acordo com a localização topográfica das lesões: frontal, parietal, temporal, occipital, infratentorial, núcleos da base (incluindo cápsula interna), periventricular, calosa/ subcalosa e justacortical.

As medidas de volume do parênquima cerebral foram realizadas através das imagens no plano axial T2 “fast spin echo” (espessura de 6 mm) e sagital “gradient echo” T1 (espessura de 1 mm). A fração do parênquima cerebral total foi obtida com a mesma

técnica utilizada para análise do volume das lesões através de marcadores colocados apenas nos hemisférios cerebrais. Valores < 2 desvios padrão da média do grupo controle foram considerados anormais.

As lesões cerebrais e as frações do parênquima cerebral foram identificadas e quantificadas por um dos autores (H.H.R.) que não teve acesso aos dados clínicos e laboratoriais (Figura 1).

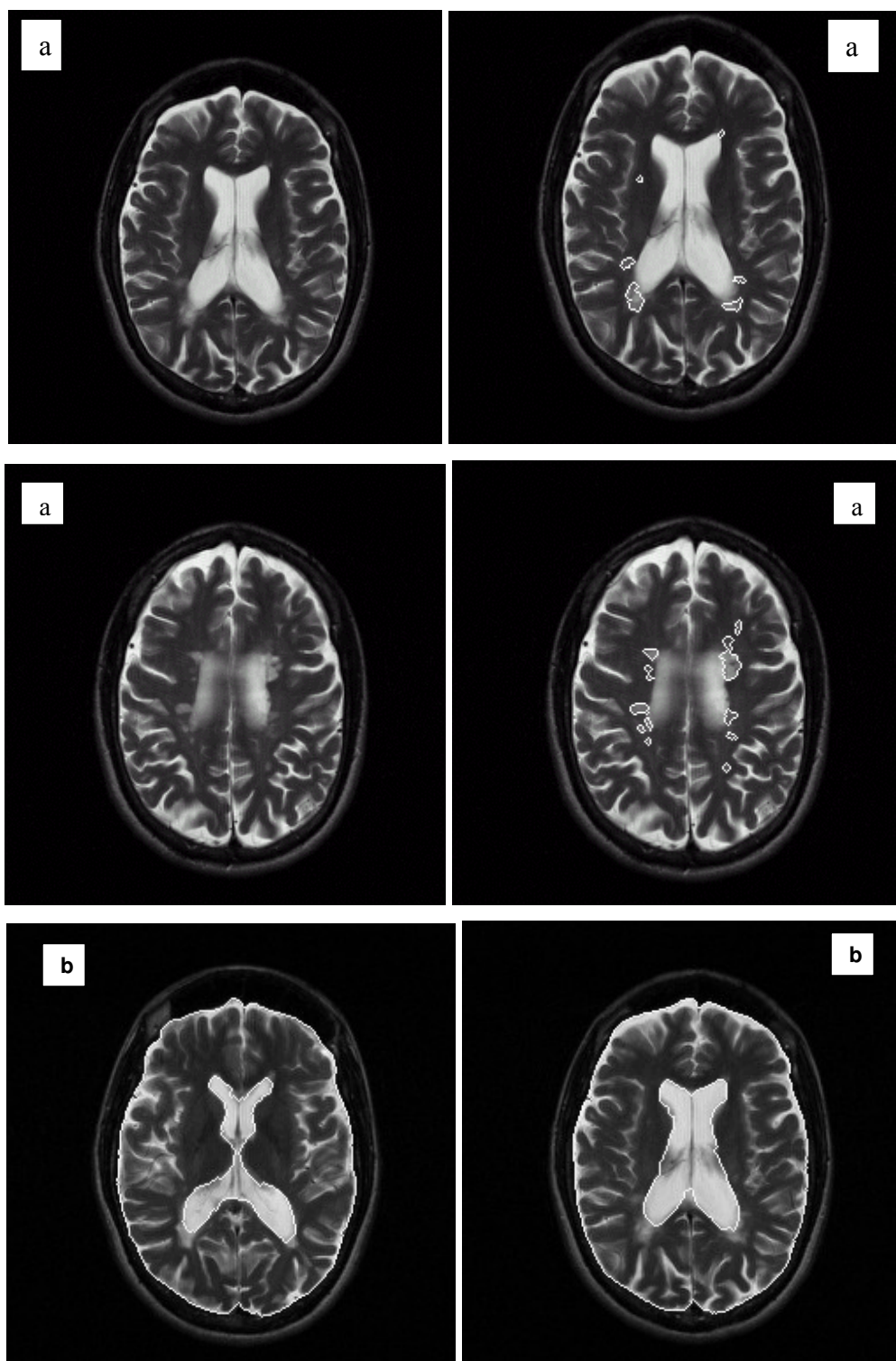


Figura 1- Imagens obtidas em um sistema de 2T, com segmentação das lesões e medida do volume cerebral, utilizando um programa semi-automático. Em detalhes, seqüência de marcadores nas regiões de interesse para segmentação de lesões (1a) e volume cerebral (1b) de um paciente com esclerose múltipla.

3.5- Estatística

Para descrever o perfil da amostra segundo as diversas variáveis em estudo, foram feitas tabelas de frequência das variáveis categóricas (sexo, etc.) e estatísticas descritivas (mediana, média, desvio padrão, mínimo e máximo) das variáveis contínuas (Q IgG, QAlb, etc.).

Para analisar a associação entre as variáveis categóricas (Volume, Índice IgG) foi utilizado o teste exato de Fisher. Para comparação das variáveis de interesse entre os grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney para comparar dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para mais de dois grupos.

Com o objetivo de verificar a existência de correlação (associação linear) entre as variáveis estudadas foi utilizado o coeficiente de Correlação de Spearman. Este coeficiente assume valores de -1 a $+1$, quanto mais próximo de zero, menos correlacionadas são as variáveis, e quanto mais próximo de 1 ou -1 , mais correlacionadas são as variáveis.

O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5%, ou seja, $p < 0.05$.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa SAS System for Windows (Statistical Analysis System), 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

4- RESULTADOS

Cinquenta e quatro pacientes foram avaliados em dois momentos, durante a investigação diagnóstica e após tratamento com imunomodulador por três anos.

O resumo dos resultados está demonstrado na Tabela 1 e os dados completos de todas as análises estão documentados nos apêndices.

Tabela 1- Sumário dos achados clínicos, laboratoriais e de neuroimagem

Parâmetro	Pacientes EM- ponto 1	Pacientes EM- ponto 2
Número de pacientes	54	54
Feminino: masculino	37: 17	37: 17
Idade média de início, anos (DP)	30 (9.6)	30 (9.6)
Faixa de idade, anos	10- 46	10- 46
Duração média da doença, anos	10 (5.8)	11 (5.7)
Faixa de duração da doença, anos	1- 29	3- 31
Média da taxa de surtos/ ano	1.4 (1.0)	0.4 (0.4)
Faixa da taxa de surtos	0.3- 6.0	0- 2.0
Média da EDSS (DP)	2.6 (1.2)	4.3 (2.0)
Faixa da EDSS	1- 6	1- 8
Média do Índice IgG (DP)	0.9 (0.4)	0.8 (0.3)
Faixa do Índice IgG	0.3- 2.3	0.3- 2.4
Média de leucócitos	6 (8.4)	4 (4.6)
Faixa dos leucócitos	1- 46	1- 25
Média do número de placas	69 (46.4)	63 (43.9)
Faixa do número de placas	0- 172	0- 173
Média VTL(cm3)	13.9 (13.5)	15.4 (17.6)
Faixa VTL (cm3)	0- 59.6	0- 87.0
Média do VC (cm3)	947.6 (82.9)	952.5 (88.5)
Faixa do VC (cm3)	756.7- 1084.8	734.7- 1118.7

EDSS = escore EDSS no início; VTL= volume total lesão; VC= volume cerebral;

Índice IgG = (LCR IgG/ Soro IgG): (LCR Alb/ Soro Alb); DP, desvio padrão;

EM, esclerose múltipla

4.1- Fase diagnóstica – ponto 1

4.1.1- Análise das imagens por ressonância magnética

Anormalidades nas imagens cerebrais por ressonância magnética (IRM) compatíveis com lesões desmielinizantes foram observadas em 51 (94.4%) pacientes com EM. Lesões na medula espinhal foram encontradas em três pacientes (5.6%) sem lesões no crânio. A IRM mostrou lesões com captação do gadolínio (GD+) em seis pacientes. Os valores medidos da fração do volume do parênquima cerebral (VC) foram significativamente menores que o grupo controle de indivíduos saudáveis (média $\pm$ DP volume VC, 947.6 ± 82.9 e 1115.2 ± 131.3 , respectivamente; $p < 0.001$). Foi observada, no início do curso clínico, diminuição importante do VC (< 2 desvios padrão da média dos controles) em cinco pacientes (10%).

4.1.2- Análise das amostras de LCR e soro

Pleocitose (> 5 leucócitos/ mm^3) no LCR ocorreu em 22 (40%) pacientes e síntese intratecal de IgG (Índice IgG >0.7) foi observada em 38 (72%). Quarenta e cinco (83%) pacientes apresentaram bandas oligoclonais IgG.

4.1.3- Análise dos dados clínicos

No momento da primeira avaliação, todos os pacientes deambulavam sem apoio (EDSS ≤ 4.5) exceto um paciente que apresentou surto medular com seqüela motora (EDSS= 6).

4.1.4- Análise dos parâmetros laboratoriais em comparação com os dados clínicos

Os seis pacientes que a IRM mostrou lesões com captação do gadolínio (Gd+) apresentaram pleocitose no LCR e valores elevados do Índice IgG. As medidas do volume total das lesões (VTL) e contagem global de placas na IRM de crânio mostraram uma

correlação estatisticamente significativa com a EDSS ($p= 0.0002$, $r= 0.5005$ e $p= 0.007$, $r= 0.38$, respectivamente) (Fig. 2A, 2B), assim como a duração da doença ($p= 0.0079$, $r= 0.37$ e $p= 0.038$, $r= 0.29$), respectivamente (Fig. 3A, 3B).

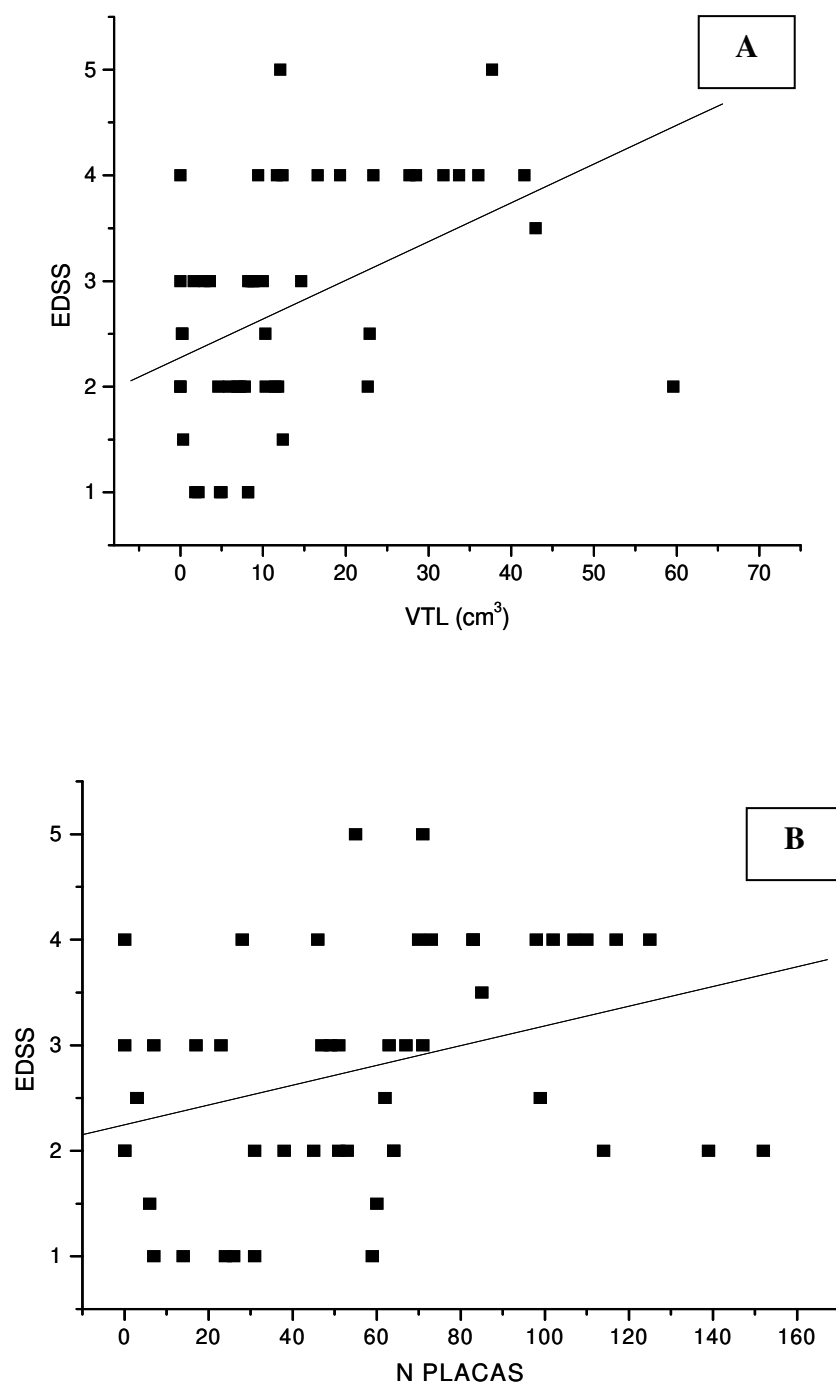
Corroborando os dados fornecidos pelo programa semi-automático, a análise visual das lesões demonstrou que o número de lesões periventriculares e justacorticais também foi correlacionado com os escores da EDSS ($p= 0.0037$, $r= 0.4035$ e $p= 0.0305$, $r= 0.3963$, respectivamente) (Fig. 4, 5) e síntese intratecal de IgG ($p= 0.0220$, $r= 0.3233$ e $p= 0.0056$, $r= 0.3860$, respectivamente) (Fig. 6, 7).

Além disso, uma correlação inversa entre a duração da doença e contagem global de leucócitos foi observada ($p= 0.019$, $r= -0.33$) (Fig. 8).

Os valores do Índice IgG foram positivamente correlacionados com o volume total das lesões ($p= 0.043$, $r= 0.29$) (Fig. 9). Contudo, nenhuma relação foi encontrada entre Índice IgG, EDSS ($p= 0.61$, $r= 0.29$) e fração do volume cerebral (VC) ($p= 0.51$, $r= 0.095$).

VC foi inversamente correlacionado com duração da doença e número de surtos ($p= 0.0385$, $r= -0.293$ e $p= 0.0256$, $r= -0.315$, respectivamente). Em contraste, nenhuma correlação foi observada entre VC, EDSS ($p= 0.1949$, $r= -0.18642$) e volume total das lesões ($p= 0.6605$, $r= -0.06366$).

Houve uma correlação positiva entre a contagem global de leucócitos e Índice IgG ($p= 0.046$, $r= 0.284$) (Fig. 10).



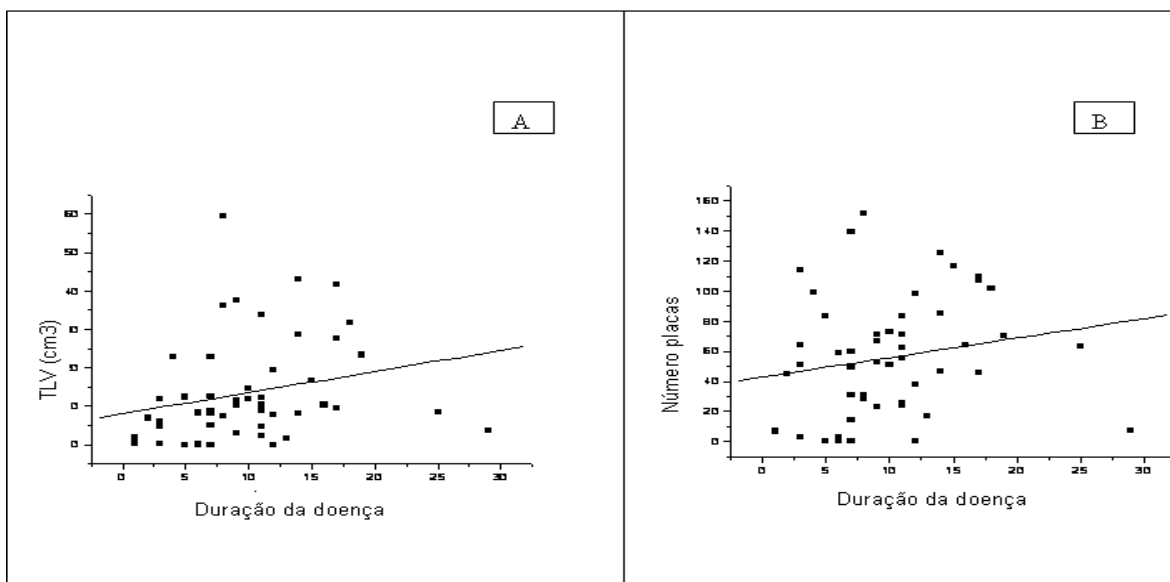


Figura 3- Correlação entre duração da doença e volume total das lesões ($p=0.0079$, $r=0.37$) (A) e número de placas ($p=0.038$, $r=0.29$) (B).

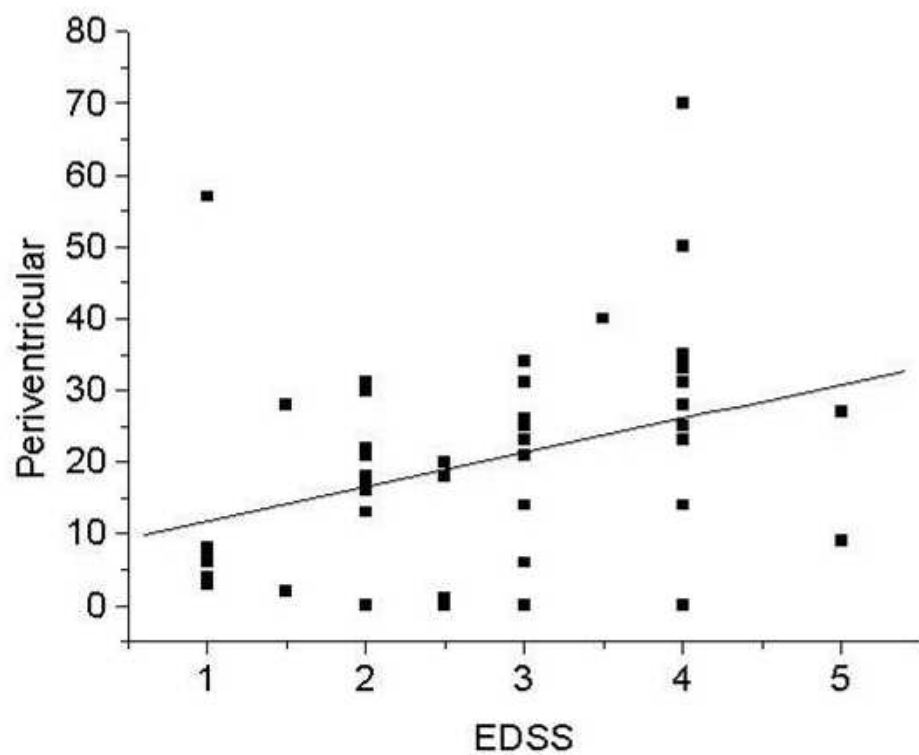


Figura 4- Correlação entre a EDSS e o número de lesões periventriculares ($p=0.0037$, $r=0.4035$).

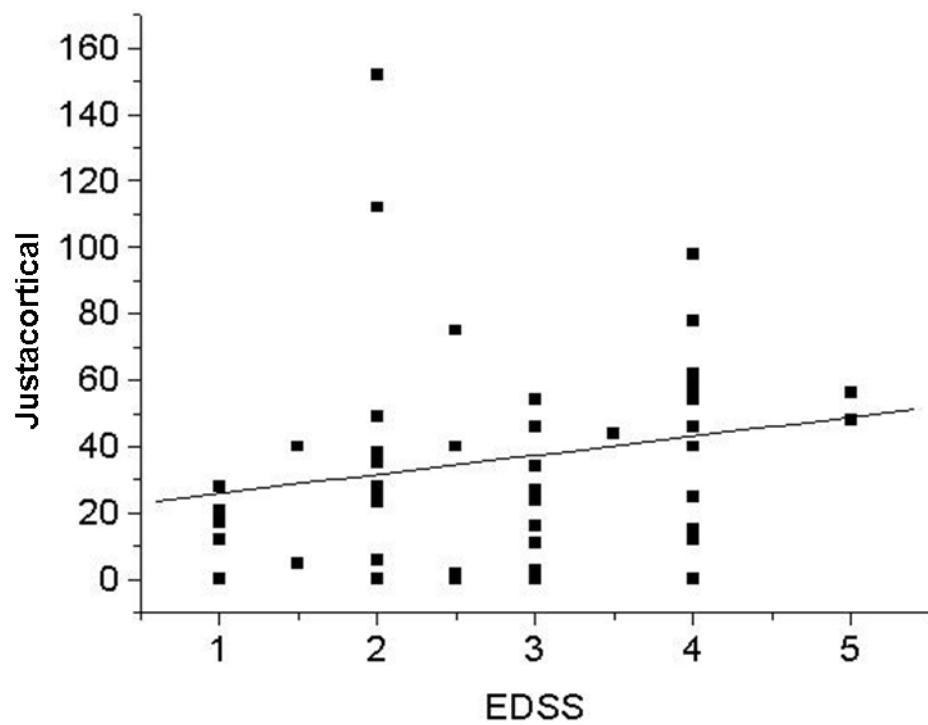


Figura 5- Correlação entre a EDSS e o número de lesões justacorticais ($p=0.0305$, $r=0.3963$).

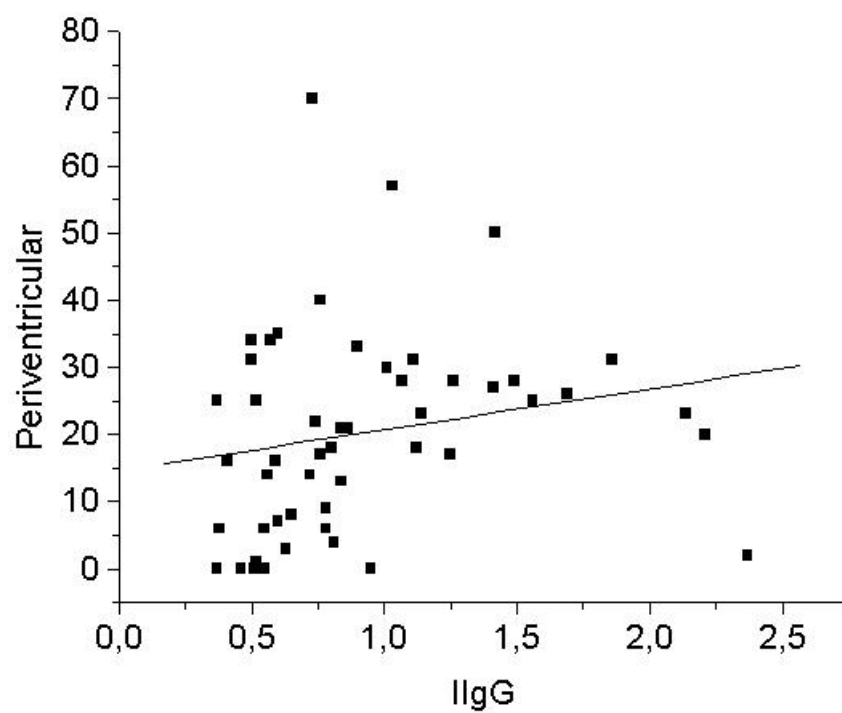


Figura 6- Correlação entre o Índice de IgG e o número de lesões periventriculares ($p=0.0220$, $r=0.3233$).

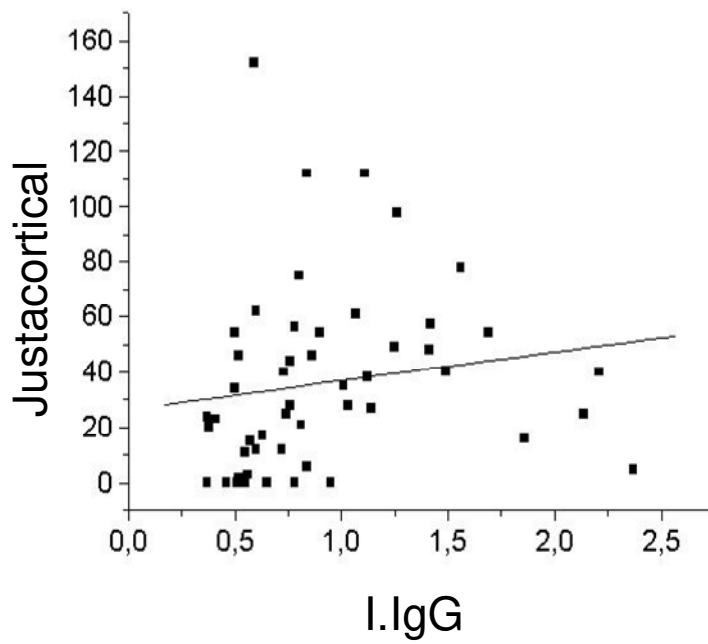


Figura 7- Correlação entre Índice de IgG e número de lesões justacorticais ($p=0.0056$, $r=0.3860$).

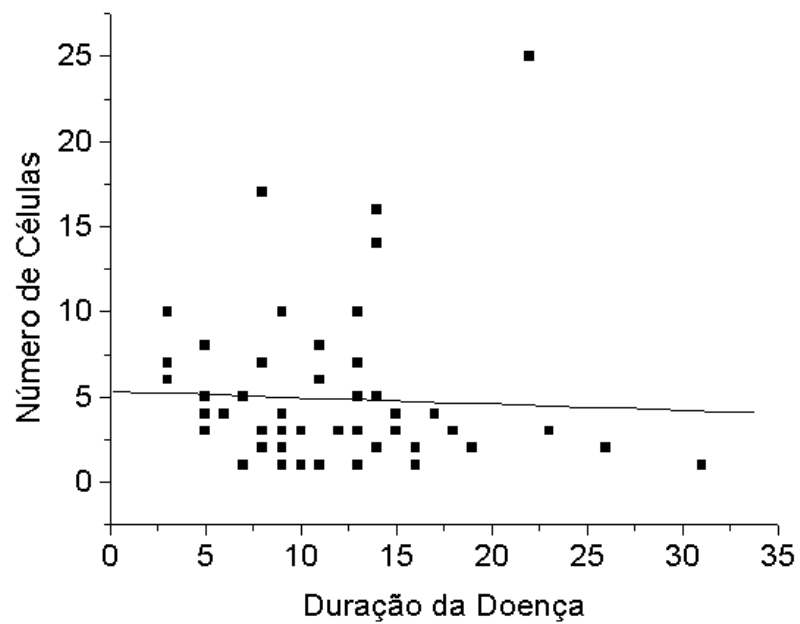


Figura 8- Correlação entre duração da doença e o número de células no LCR ($p=0.019$, $r= - 0.33$).

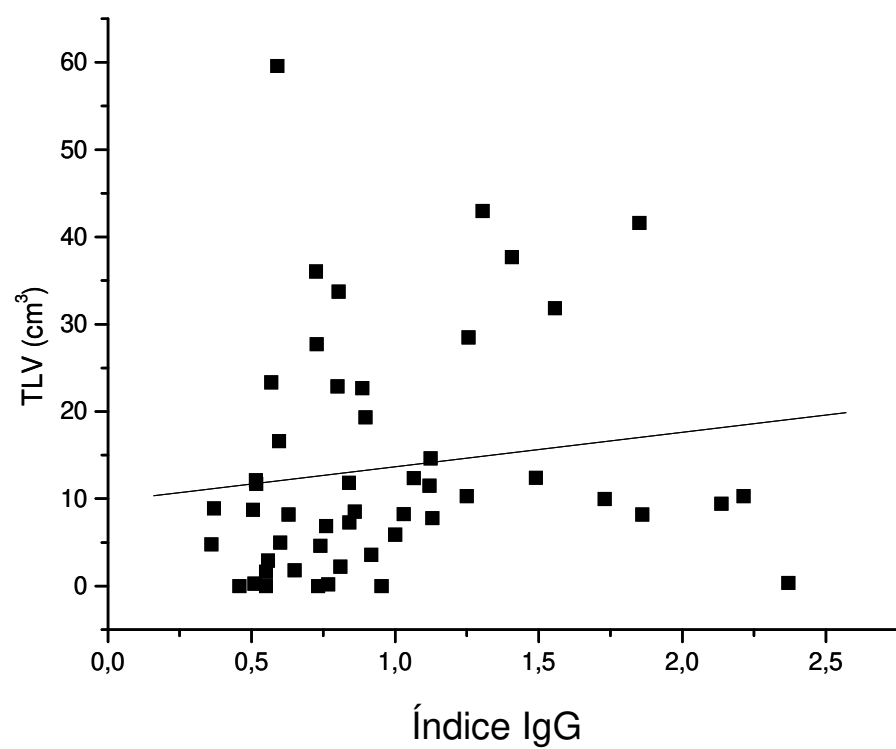


Figura 9- Correlação entre Índice IgG e volume total de lesões ($p=0.043$, $r=0.29$).

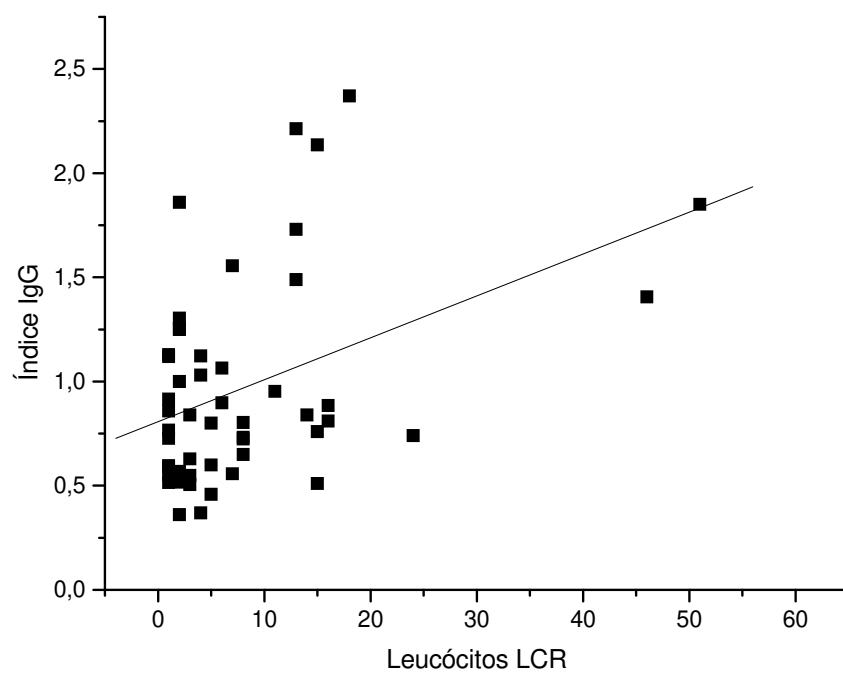


Figura 10- Correlação entre o número de leucócitos no LCR e Índice IgG ($p=0.046$, $r=0.284$).

4.1.5- Análise das citocinas em pacientes com EM e controles (Fig. 11)

A quantificação das citocinas foi realizada em amostras de LCR e soro, coletadas de vinte e três pacientes com EMRR durante remissão clínica antes do início do tratamento com imunomodulador. O resumo dos dados clínicos e os demais parâmetros do LCR são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2- Dados clínicos e laboratoriais de pacientes EM remitente-recorrente antes do tratamento.

Pacientes	Idade, a	Sexo	DD	N.s.	EDSS1	Células	I-Alb	I-IgG	BO IgG
1	44	M	1	2	1	8	2.6	0.65	+
2	32	M	3	4	2.5	15	5.23	0.51	-
3	32	F	3	3	1.5	20	3.64	3.35	+
4	37	M	3	5	2	2	2.82	1.0	+
5	30	F	4	4	3	3	2.25	0.82	+
6	22	F	4	5	2	16	2.4	0.98	+
7	10	F	8	2	2	14	5.84	0.84	+
8	25	F	7	4	1.5	13	2.7	1.49	+
9	43	M	9	6	2	1	7.97	1.12	+
10	24	F	2	4	2	15	3.25	0.76	+
11	46	F	9	3	3	13	6.4	1.73	+
12	43	F	12	6	2.5	3	4	0.88	+
13	33	F	5	4	1.5	1	5.13	0.67	+
14	35	F	13	5	2	3	1.97	1.52	+
15	29	F	11	3	1	16	5.9	0.81	+
16	43	M	8	2	2	1	1.66	0.59	-
17	25	F	5	4	2	5	3.44	0.83	+
18	13	M	3	9	2	24	4	0.74	+
19	21	M	7	3	1	5	6.17	0.6	+
20	37	F	1	2	1.5	18	5.1	2.37	+
21	21	F	7	6	1.5	5	5.35	1.66	+
22	39	F	6	2	1	4	5.37	1.03	+
23	40	F	4	3	2.5	5	4	0.8	+

DD= duração da doença; EDSS1= Expanded Disability Status Scale no momento do estudo;

Alb-I = índice albumina; IgG-I = índice IgG; BO IgG = banda oligoclonal IgG; N.s.= n. surtos

As citocinas (TNF α , IL12p40, IFN γ e IL10) foram quantificadas e comparadas aos grupos controle (Tabela 3). As características clínicas e os parâmetros do LCR estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3- Características dos pacientes, citologia global e síntese intratecal de IgG.

Pacientes	Idade, a	Te, a	Sexo, M/F	Células	Índice IgG	BO IgG+
EM (23)	30 $\pm$ 9	5 $\pm$ 3	6/ 17	9.13 $\pm$ 7.05	1.12 $\pm$ 0.66	21/ 23
ODN (16)	31 $\pm$ 10	6 $\pm$ 3	3/ 13	4.19 $\pm$ 5.55	0.53 $\pm$ 0.13	1/ 16
LES (23)	31 $\pm$ 10	7 $\pm$ 4	0 / 23	2,26 $\pm$ 1,76	0,54 $\pm$ 0,24	0/ 23
CS (19)	37 $\pm$ 16	NA	6/ 13	1.47 $\pm$ 0.77	0.45 $\pm$ 0.12	0/ 19

EM= esclerose múltipla; ODN= outras doenças neurológicas; CS= saudáveis;

BO= bandas oligoclonais; Te= tempo de evolução; a= anos; LES= lupus

DP= desvio padrão; NA= não aplicável.

Os vinte e três pacientes EMRR (100%) apresentaram lesões desmielinizantes na IRM e a presença de captação de gadolínio (Gd+) foi observada em cinco (21%) dos 23 pacientes. Estes pacientes mostraram pleocitose no LCR e síntese intratecal de IgG. Bandas oligoclonais IgG foram detectadas em vinte e um (91.3%) pacientes. A pleocitose no LCR foi significativamente maior quando comparada com os grupos II (ODN; $p= 0.004$), grupo III (LES; $p= 0.001$) e grupo IV (CS; $p= 0.0001$).

4.1.5.1- Dosagem de IFN γ (Fig. 11A)

As médias para os pacientes EMRR foram 500.9 $\pm$ 169.5 e 359.0 $\pm$ 85.1 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo ODN foram 418.6 $\pm$ 67.0 e 325.2 $\pm$ 70.5 pg/ml; no grupo LES foram 404.9 $\pm$ 247.1 e 254.0 $\pm$ 77.6 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; nos indivíduos saudáveis (CS) foram 102.6 $\pm$ 102.7 e 54.1 $\pm$ 39.6 pg/ml. Um significativo aumento ($p < 0.001$) nos níveis de IFN γ foi observado no LCR e soro de pacientes com EM, ODN e LES.

4.1.5.2- Dosagem de TNF α (Fig. 11B)

As médias para os pacientes EMRR foram 137.3 ± 119.7 e 116.0 ± 115 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo de ODN foram 7.6 ± 24.1 e 8.6 ± 28.4 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo LES foram 434.6 ± 335.1 e 384.4 ± 194.4 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo controle CS foram 15.3 ± 19.8 e 4.3 ± 8.2 pg/ml no soro e LCR, respectivamente. Um significativo aumento ($p < 0.001$) nos níveis de TNF α foi observado no LCR e soro dos pacientes EMRR e LES. Os níveis de TNF α no LCR excederam aqueles detectados no soro em 10/ 23 pacientes do grupo EMRR e em 12/ 19 pacientes do grupo LES, sugerindo uma síntese intratecal. Também foi observada uma correlação positiva entre o número de leucócitos no LCR e os níveis de TNF α no grupo EM ($r = 0.6874$, $p = 0.001$).

4.1.5.3- Dosagem de IL10 (Fig.11C)

As médias nos pacientes EM foram 304.6 ± 112.0 e 287.6 ± 113.7 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo ODN foram 507.6 ± 187.1 e 424.3 ± 113.7 pg/ml; no grupo LES foram 518.2 ± 198.8 e 424.0 ± 184.8 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; nos indivíduos saudáveis (CS) foram 354.6 ± 111.4 e 296.2 ± 74.8 pg/ml. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os pacientes EM e os indivíduos saudáveis ($p > 0.005$), enquanto os pacientes dos grupos ODN e LES mostraram significativo aumento dos níveis de IL10 ($p = 0.006$).

4.1.5.4- Dosagem de IL12p40 (Fig. 11D)

As médias para pacientes EM foram 49.1 ± 18.3 e 39.4 ± 13.2 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; no grupo ODN foram 76.2 ± 32.2 e 58.1 ± 35.1 pg/ml; no grupo LES foram 62.1 ± 21.7 e 59.5 ± 20.6 pg/ml no soro e LCR, respectivamente; nos indivíduos controles saudáveis (CS) estas médias foram 57.4 ± 18.8 e 45.4 ± 15.3 pg/ml. Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) foi observada entre os grupos.

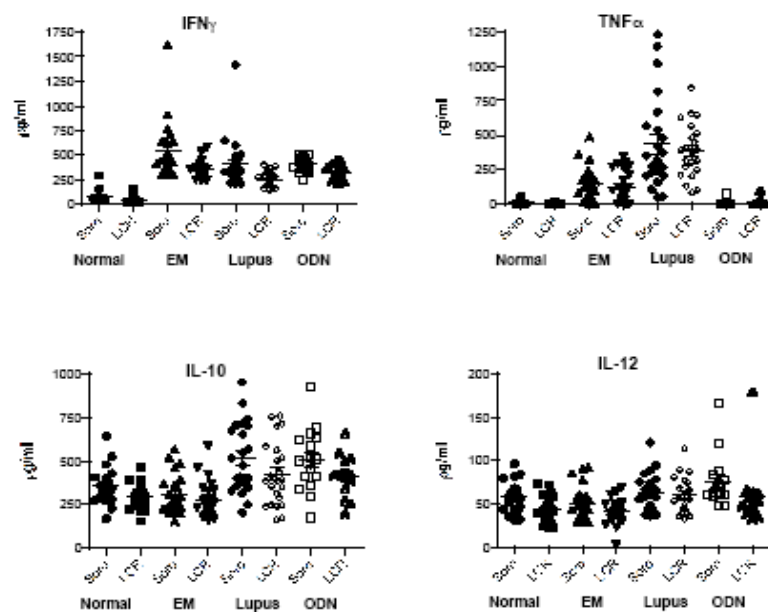


Figura 11- Análise das citocinas em pacientes com EMRR e controles (outras doenças neurológicas, lupus eritematoso sistêmico e indivíduos saudáveis).

4.2- Fase de tratamento - Ponto 2 (Tabela 1)

Os pacientes EM foram acompanhados e avaliados após uma média de $6,3 \pm 2.7$ anos, variando entre três e dez anos, todos em tratamento com imunomodulador.

4.2.1- Análise das imagens por ressonância magnética

A IRM cerebral mostrou anormalidades em 51 pacientes (94.4%), 35 (64%) com captação do gadolínio (Gd+). Não houve redução na carga lesional medida pelo VTL ($p=0.53$) e as medidas de volume cerebral (VC) não mostraram diferenças significativas ao longo do período analisado.

4.2.2- Análise das amostras de LCR e soro

Pleocitose (> 5 leucócitos/mm³) no LCR ocorreu em 16 (30%) pacientes e síntese intratecal de IgG (Índice IgG >0.7) foi observada em 33 (61%). Quarenta e dois (78%) pacientes apresentaram bandas oligoclonais IgG. Os valores do índice IgM foram elevados (Índice IgM > 0.068) em 30 (55%) pacientes (média $\pm$ DP, 0.13 ± 0.17). Pesquisa de anticorpos IgG para Epstein-Barr vírus (EBV) foi positiva em 15 (30%) pacientes.

4.2.3- Análise dos dados clínicos

A taxa anual de surtos reduziu ($p<0.001$), porém os pacientes apresentaram aumento na EDSS ($p<0.001$), que foi mais elevada nos pacientes do sexo masculino.

No momento da segunda avaliação (após no mínimo três anos de seguimento), 18 (33%) pacientes atingiram EDSS ≥ 6.0 e já necessitavam de pelo menos apoio unilateral.

Somente seis (20%) dos 29 pacientes com duração da doença ≥ 10 anos foram classificados como portadores da forma benigna (EDSS < 3). Somente um (8,3%) dos 12 pacientes com pesquisa de bandas oligoclonais IgG negativa foi classificado como forma benigna e apresentou, já no início do curso clínico, redução importante do VC (atrofia cerebral).

4.2.4- Análise dos parâmetros laboratoriais em comparação com os dados clínicos

As correlações do Índice IgG com volume total das lesões ($p= 0.0377$, $r= 0.28626$) e contagem global de leucócitos ($p< 0.001$, $r= 0.479$) continuaram significativas. Houve também correlação inversa da duração da doença com a contagem global dos leucócitos ($p= 0.0442$, $r= -0.275$) e volume cerebral ($p=0.0235$, $r= -0.3232$).

O número de surtos também se correlacionou inversamente com o volume cerebral ($p= 0.0256$, $r= -0.315$). A evolução da EDSS não mostrou correlação com VTL ou com o volume cerebral, mas a EDSS se correlacionou com a duração da doença ($p= 0.05$, $r= 0.479$).

Houve uma correlação positiva entre o Índice IgG e o Índice IgM ($p= 0.0122$, $r= 0.34527$) (Fig. 12). Não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa entre a síntese intratecal de IgM, EDSS, carga total de lesões (VTL) e fração do volume cerebral (VC). Contudo, houve uma associação significativa entre a síntese intratecal de IgM e captação de gadolínio na IRM ($p< 0.001$).

Não houve associação significativa ($p>0.05$) entre a presença de anticorpos do vírus EBV no LCR, carga de lesões na IRM e marcadores inflamatórios do LCR (células e síntese intratecal de anticorpos IgG e IgM) (Figura 13).

Devido à diferença de tempos de evolução entre os pacientes, a análise foi feita corrigindo todos os deltas pelo tempo de evolução. Verificou-se diferença significativa entre os tempos apenas para a escala EDSS (aumento do escore) e a taxa anual de surtos (redução do escore), tanto usando os dados originais como os com correção pelo tempo de seguimento.

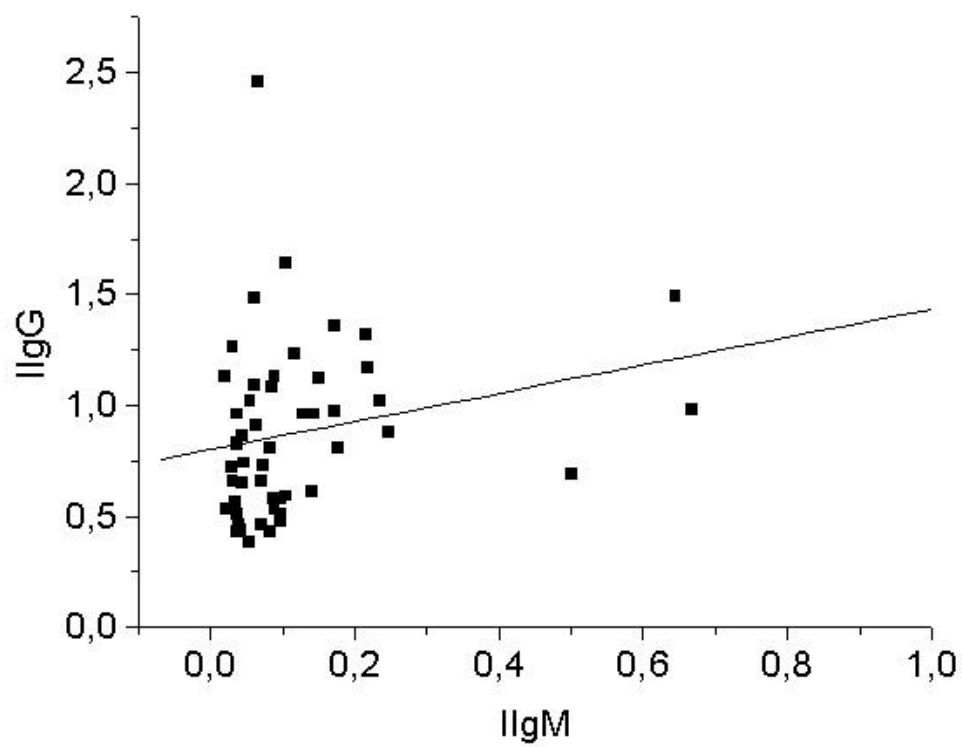


Figura 12- Correlação entre o Índice IgM e o Índice IgG ($p=0.0122$, $r=0.34527$).

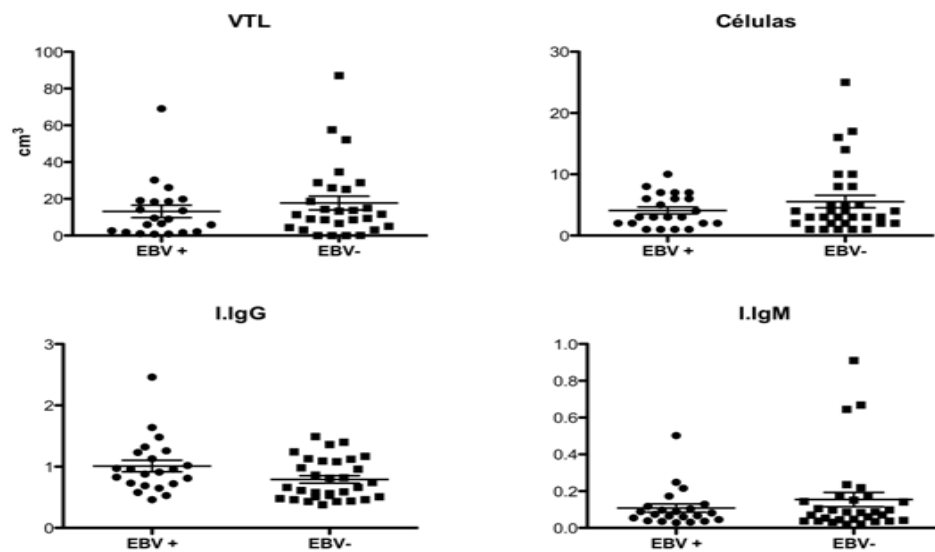


Figura 13- Não houve associação significativa entre a presença de anticorpos do vírus EBV no LCR de pacientes EMRR tratados com imunomodulador, carga lesional pela IRM e marcadores de inflamação no LCR ($p > 0.05$).

4.3- Quantificação de biomarcadores de neurodegeneração no LCR (Figura 14)

Amostras de LCR, coletadas de treze pacientes EMRR sem tratamento e vinte e oito em uso de imunomodulador, foram avaliadas para P-tau e T-tau e comparadas ao grupo controle de pacientes saudáveis (CS).

4.3.1- Dosagem de P-tau

As médias e desvios padrão para os pacientes EM sem tratamento foram $35,52 \pm 11,52$ pg/ml no LCR; no grupo EM tratado com imunomodulador foram $30,72 \pm 9,22$ pg/ml no LCR; no grupo controle CS foram $38,32 \pm 19,37$ pg/ml no LCR. Nenhuma diferença significativa ($p > 0.05$) foi observada entre os grupos.

4.3.2- Dosagem de T-tau

As médias e desvios padrão para os pacientes EM sem tratamento foram $256,62 \pm 74,54$ pg/ml no LCR; no grupo EM tratado com imunomodulador foram $218,89 \pm 8,95$ pg/ml no LCR; no grupo controle CS foram $174,00 \pm 79,17$ pg/ml no LCR. Foi observado um aumento significativo ($p < 0.05$) dos níveis de proteína T-tau dos pacientes EM sem tratamento quando comparados com o grupo controle (CS) ($p < 0.01$) e com o grupo EM tratado com imunomodulador ($p < 0.05$) (Figura 13). Não houve diferença significativa entre o grupo EM tratado e o grupo controle (CS) ($p > 0.05$).

4.3.3- Análise dos biomarcadores em comparação com os demais parâmetros laboratoriais e dados clínicos

A avaliação dos níveis de T-tau e P-tau no LCR de pacientes EM sem tratamento e em uso de imunomodulador não mostrou associação significativa com os demais parâmetros clínicos, laboratoriais e neuroimagem ($p > 0.05$).

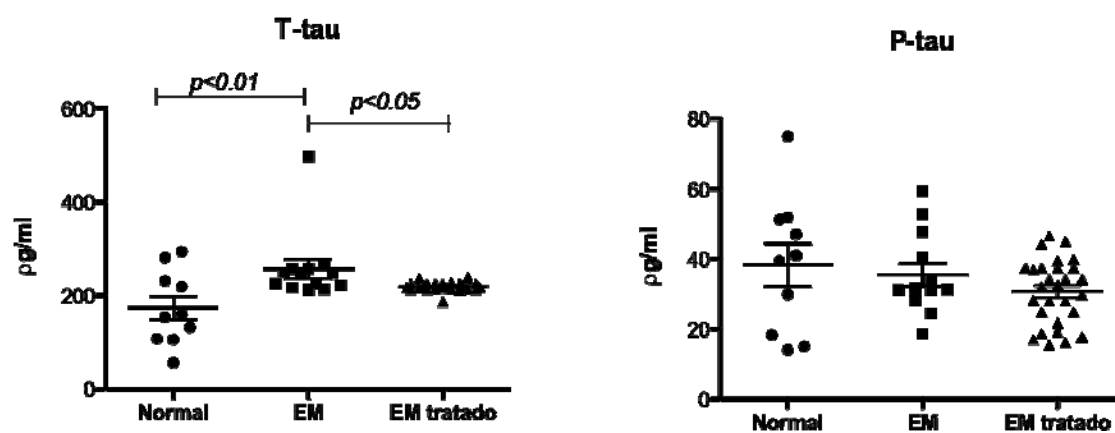
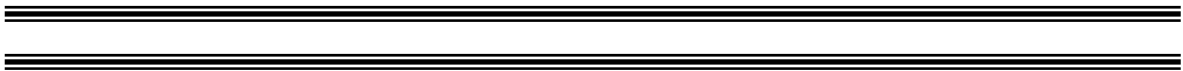


Figura 14- Quantificação das proteínas T-tau e P-tau no LCR de pacientes com EMRR sem tratamento, EMRR após tratamento com imunomodulador e controles saudáveis.

5- DISCUSSÃO



Os parâmetros clínicos mais utilizados para monitorizar o tratamento na esclerose múltipla são: a ocorrência de surtos e o grau de incapacidade clínica através da escala EDSS (28). Estes parâmetros representam aspectos fundamentais da doença, mas são limitados. Os surtos são relativamente raros e com certo grau de subjetividade; a EDSS tem baixa reprodutibilidade e baixa sensibilidade (278,305). Atualmente a IRM tem sido um bom método para controle de tratamento nos ensaios clínicos dos pacientes com EM, pois detecta atividade da doença mesmo em situações de relativo silêncio clínico. Contudo, os exames convencionais de IRM oferecem informações incompletas sobre o grau de inflamação e neurodegeneração que ocorrem durante o processo patológico da EM (252,306,307,308).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo associar os dados obtidos nas imagens por ressonância magnética e os parâmetros inflamatórios do soro e LCR dos pacientes, além do acompanhamento clínico de pacientes em tratamento com imunomoduladores.

O estudo foi dividido em duas etapas: Inicialmente, foi avaliada a atividade inflamatória em pacientes EMRR durante remissão clínica; no segundo momento foi observada a evolução clínica associada ao tratamento com imunomoduladores.

5.1- Avaliação da atividade inflamatória antes do tratamento

A atividade inflamatória foi avaliada através da quantificação das citocinas com efeitos pró e antiinflamatório presentes no sangue e no LCR dos pacientes, associada com a presença de bandas oligoclonais (BO). Os resultados mostraram um aumento de citocinas inflamatórias no soro e LCR associados ao aumento da síntese intratecal de IgG e número de leucócitos no LCR destes pacientes, mesmo durante um período clínico aparentemente estável. Este estudo também demonstrou que pacientes estáveis do ponto de vista clínico podem apresentar um elevado número de leucócitos no LCR, quando comparados com pacientes com outras doenças não inflamatórias do SNC e controles saudáveis. A presença de leucócitos no LCR pode ser considerada um marcador de atividade. Em estudo anterior

foi demonstrado, após dois anos de seguimento, que os pacientes com elevado número de leucócitos no LCR apresentaram mais surtos do que os grupos controle (309). Em nossa série, paralelamente ao aumento do número de células no LCR, foi também demonstrada a presença de bandas oligoclonais em 91 % dos pacientes EMRR. Estes dados estão em concordância com estudos prévios em pacientes brasileiros (215,216). Alguns autores mostraram que a ausência de bandas oligoclonais está relacionada a um curso mais benigno da EM (310,311). Os dados do presente estudo não corroboram estes autores e apóiam trabalho recente que mostrou a correlação da presença de BO com outros indicadores de inflamação, mas a ausência de BO não apresentou associação com um curso mais benigno da doença (312). Em nosso estudo, 12 pacientes (24%) apresentaram BO negativas e destes, somente um (8,3%) foi classificado como forma benigna, porém com redução importante do volume cerebral (atrofia cerebral). Outro estudo avaliou a relação da presença de BO com a localização das lesões e não encontrou correlação, sugerindo que as células B podem estar localizadas nas meninges e no parênquima (313). Estudo recente demonstrou não haver diferença no preenchimento dos critérios de Barkhof entre os pacientes com BO negativas e BO positivas, mas houve diferença no padrão de lesões com predomínio de lesões justacorticais e menor frequência de lesões infratentoriais nos pacientes com BO negativas quando comparados com os pacientes BO positivos (314). Em nosso estudo, não observamos diferenças na carga lesional da IRM entre os pacientes negativos e positivos para bandas oligoclonais IgG.

5.1.1- Avaliação das citocinas no LCR e soro

A proliferação, diferenciação e produção de anticorpos pelas células B são coordenadas pelos linfócitos T auxiliares e pelas citocinas por eles produzidas. O acúmulo perivascular de células mononucleares no SNC e a presença de células T auto-reativas no sangue e LCR são característicos da EM e sugerem a participação das citocinas na patogênese da doença (315,316). As células Th1 e Th2 são produtores de citocinas, porém outras células dentro e fora do sistema imune também produzem estas citocinas. Estudos anteriores demonstraram a presença de resposta imunológica aberrante na EM e que, provavelmente, o espectro das citocinas deve influenciar o processo patológico da doença

(317,318,319). As citocinas produzidas nas fases iniciais da resposta imune, como IL12, contribuem para o desenvolvimento de resposta Th1. O sistema IL12/ IL12R estabelece uma ponte entre a resposta imunológica inata e adaptativa. Alguns autores apontam uma falha na regulação deste sistema na EM (320). Contudo, resultados conflitantes têm sido observados e um aumento na produção desta citocina vem sendo demonstrado na fase progressiva da doença. O aumento da frequência de monócitos secretando IL12 parece estar correlacionado com a presença de lesões cerebrais ativas detectadas na IRM (321). Por outro lado, alguns relatos mostraram que os níveis séricos de IL12 podem ser semelhantes em pacientes EM e controles (322). No presente estudo foi observado uma redução na produção desta citocina no LCR, mas estudando o plasma de pacientes sem tratamento, demonstramos aumento de IL12. O tratamento com beta-interferona reduziu os níveis de TNF α e IFN γ , mas não houve mudanças nos níveis plasmáticos de IL-12 (323). No entanto, os níveis normais das citocinas não excluem a função destes mediadores, uma vez que mesmo em baixas concentrações, o efeito pró-inflamatório pode ocorrer pelo aumento da expressão dos receptores para citocinas (320).

A outra citocina avaliada em nosso estudo foi o IFN γ que mostrou um aumento significativo no LCR e soro em relação ao grupo controle saudável, embora sem diferença significativa com os grupos das outras doenças neurológicas (ODN e LES). Inicialmente, os interferons foram testados como agentes terapêuticos para EM pela sua ação antiviral e pela hipótese de origem viral da EM. Contudo, foram descritos efeitos patogênicos em pacientes que receberam IFN γ in vivo (324). Nossos dados apóiam outros estudos que demonstraram o papel importante do IFN γ na resposta pró-inflamatória, incluindo a habilidade de induzir a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (325,326,327,328,329). No modelo animal, a produção de isotipos de IgG, como IgG2a, é induzida pelo IFN γ . Em nossos resultados, nenhuma informação sobre as classes de IgG foi fornecida, mas é possível que a síntese intratecal de IgG seja influenciada pela síntese intratecal de IFN γ . Com relação aos pacientes com LES, trabalhos recentes sugerem que a ativação policlonal e maturação das células B que ocorrem nesta doença são dependentes de células T e o aumento da expressão de IFN γ nestas células pode contribuir para a imunopatogênese da doença (330,331).

Paralelamente à produção de IFN γ , foi detectado um aumento de TNF α no soro e LCR dos pacientes do grupo EM. Aproximadamente 40% destes pacientes apresentaram níveis de TNF α no LCR iguais ou superiores ao soro, sugerindo a síntese intratecal desta citocina. TNF α é descrito como uma das principais citocinas nesta doença desmielinizante pelos efeitos mielinotóxicos (332,333,334,335,336). TNF α é também um indutor das moléculas de adesão e quimiocinas e seu estímulo pode gerar um efeito maior no recrutamento dos leucócitos para o SNC (337). Nesta mesma avaliação, foi possível demonstrar uma correlação positiva entre o número de leucócitos no LCR e os níveis de TNF α ; isto poderia explicar, pelo menos em parte, o aumento do número de leucócitos observado no LCR e a perpetuação da inflamação na EM. Em nossa série, os pacientes do grupo LES também apresentaram elevados níveis de TNF α no soro e LCR. Neste caso, o papel do TNF α é ainda discutível e alguns trabalhos sugerem que esta citocina pode ter função protetora (330,338,339,340). Por outro lado, alguns autores sugerem que o aumento de citocinas pró-inflamatórias na periferia, como o TNF α , pode contribuir para o aumento da secreção intratecal de metabólitos do óxido nítrico (NO) e, conseqüentemente, o aparecimento das manifestações neuropsiquiátricas do LES (341). Outro relato recente sugere que a ligação de auto-anticorpos com antígenos no LCR promove um potente estímulo de produção de interferon alpha (IFN α), quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. As evidências apontam o IFN α como um dos responsáveis pelas manifestações neuropsiquiátricas no LES (342).

Durante a resposta inflamatória na esclerose múltipla, as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 ou Th2 promovem funções inibitórias para regular os seus efeitos. IFN γ bloqueia a produção de células Th2, enquanto IL10 inibe a síntese de citocinas Th1 (343). Relatos de produção de IL10 mostraram que pacientes com níveis elevados desta citocina apresentam escores menores de incapacidade e menor carga de lesões em T2 (344). Outro trabalho demonstrou aumento de IL10 durante a fase de remissão clínica, tanto no LCR como no soro (345). Em nossa série, nós não observamos alterações significativas de IL10 nos pacientes com EM na comparação com o grupo de indivíduos saudáveis (CS) e estes dados estão de acordo com outros estudos que demonstraram o predomínio da resposta pró-inflamatória na EM (346,347,348,349), mesmo na ausência de manifestações clínicas. Outros autores sugerem uma correlação entre os níveis de IL10 no LCR e síntese

intratecal de IgG (350) que não foi observada em nossos resultados. Por outro lado, os pacientes dos grupos ODN e LES apresentaram significativo aumento dos níveis de IL10, corroborando outros estudos que demonstraram a elevação de IL10 no LCR de pacientes com manifestações neuropsiquiátricas no LES (351). Considerando as propriedades de IL10, que ativam os linfócitos B e inibem os linfócitos T, o aumento desta citocina no LES pode explicar as alterações imunológicas desta doença que é caracterizada pela produção de auto-anticorpos e deficiência na resposta T (352,353).

5.1.2- Avaliação da resposta humoral

O estímulo que inicia e perpetua a disfunção da resposta imunológica ainda não foi totalmente esclarecido e a participação das células B na patogênese da doença também tem sido muito pesquisada (354). Recentes trabalhos demonstraram acúmulo de células B, infectadas com Epstein-Barr vírus (EBV), em folículos presentes nas meninges e lesões da substância branca de pacientes com EM (355,356,357,358), que apóiam uma possível ligação da ativação anormal das células B com o processo imunopatológico mediado pelas células T. Em nosso estudo, não foi possível avaliar a síntese intratecal de anticorpo específico ou a carga viral do EBV, mas cerca de 30% dos pacientes com EM apresentaram anticorpos IgG para EBV no LCR.

Considerando a importância da participação das células B no processo patológico da EM, outro objetivo do nosso estudo foi avaliar a resposta humoral antes do tratamento e durante o curso clínico da EM. O primeiro aspecto analisado foi a comparação dos achados do LCR e as anormalidades encontradas na IRM de crânio em pacientes EMRR durante remissão clínica. Os pacientes com valores elevados de índice IgG apresentaram maior carga lesional na IRM de crânio. Estes resultados corroboram outros estudos que confirmam o papel dos anticorpos no desenvolvimento das lesões na EM (359,360). A correlação de anormalidades na RM com a síntese intratecal de IgG foi previamente demonstrada em uma série de pacientes com a forma progressiva crônica da EM (361) e em pacientes nos estágios iniciais da forma ativa da EM com surtos (309).

5.2- Avaliação da atividade inflamatória após tratamento com imunomodulador

Neste estudo, os pacientes EM foram acompanhados longitudinalmente e reavaliados após no mínimo três anos de tratamento com imunomodulador. Na avaliação da resposta humoral foi pesquisada a síntese intratecal de anticorpos IgG e IgM. Alguns autores mostraram que pacientes com síntese intratecal IgG ou IgM (362,363,364), detectadas no início da doença, tiveram um pior curso clínico, sugerindo estes parâmetros como marcadores prognósticos e orientadores de tratamento com imunomodulador. Embora uma significativa correlação da síntese intratecal de IgG e EDSS não tenha sido encontrada, nossos resultados confirmam a sensibilidade do LCR na demonstração do processo inflamatório no SNC, mesmo com a doença em remissão clínica. Houve uma associação significativa entre a síntese intratecal de IgM e lesões com captação de gadolínio na IRM, demonstrando atividade de doença neste grupo de pacientes mesmo em fase de remissão clínica e com tratamento imunomodulador. Este achado corrobora estudos que mostraram que a taxa de surtos é menos sensível que a atividade medida pela IRM de crânio em pacientes com EM (232,365).

Após o tratamento com imunomodulador a taxa de surtos reduziu, porém estes pacientes apresentaram aumento nos escores da EDSS que foram positivamente correlacionados com as medidas de carga lesional. Alguns autores demonstraram uma fraca ou moderada correlação entre o volume de lesões em T2/T1 (*black holes*) e a EDSS (366,367,368,369,370). Outros autores mostraram uma correlação da carga lesional com a EDSS somente nos pacientes com pesquisa de bandas oligoclonais IgG positivas no LCR (371). A contagem global de lesões e o volume total de lesões quantificados nos estágios iniciais da doença têm sido correlacionados com o grau de incapacidade no futuro (370,372,373). Os resultados conflitantes relatados entre IRM e grau de incapacidade são atribuídos à baixa sensibilidade da escala EDSS e um possível impacto da plasticidade na determinação da incapacidade clínica (374,375). Alguns autores sugerem que a avaliação multiparamétrica (volume de lesões em T1/T2 e medidas de N-acetil-aspartato) e as técnicas avançadas por IRM podem explicar melhor as variações da EDSS e parecem ter um grande potencial na monitorização da evolução da EM (376,377,378,379,380).

5.2.1- Avaliação do dano axonal

Os estudos de atrofia cerebral com outros marcadores neuronais pela IRM apóiam a hipótese de que a observação de atrofia cerebral é o reflexo do dano axonal acumulado e que a progressão da doença é dependente deste efeito (381,382,383). A redução do volume cerebral (atrofia) observada em nosso estudo, não mostrou associação com o grau de incapacidade. Isto pode ser explicado pelo fato da EDSS medir principalmente o componente motor da incapacidade clínica e o possível impacto da neuroplasticidade (375). Alguns autores mostraram que pacientes com a forma progressiva secundária apresentam significativamente mais atrofia quando comparados com pacientes com a forma remitente-recorrente, sugerindo o papel relevante da atrofia na determinação do curso e progressão da EM (307). Outros autores também demonstraram que a atrofia cerebral encontrada nas fases iniciais da EM pode determinar a progressão da incapacidade, sugerindo que a incapacidade clínica é determinada pelas alterações neurodegenerativas visualizadas na IRM (384,385). Alguns estudos avaliaram, separadamente, os volumes da substância branca (SB) e substância cinzenta (SC), e demonstraram que a perda da SC está relacionada com outros aspectos da patologia cerebral e tem maior relevância clínica do que a atrofia da substância branca (307,370,386,387,388). Relatos recentes enfatizam que a atrofia da SC está fortemente correlacionada com o declínio clínico e cognitivo (383) e confirmam a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de avaliação clínica e medidas de IRM mais sensíveis para um melhor entendimento da progressão da incapacidade na doença (389,390,391). É importante ressaltar que a atrofia cerebral, em nossa série, foi observada desde o diagnóstico e mostrou correlação com o número de exacerbações e o tempo de doença. Observações anteriores mostraram que a carga lesional nos cinco primeiros anos de doença parece estar mais estreitamente relacionada com o grau de atrofia cerebral (307,392). Outros relatos sugerem que o dano axonal e o volume de lesões em T2 parecem estar dissociados, pelo menos parcialmente, nos estágios iniciais da EM (393). Alguns autores mostraram uma relação entre atrofia cortical, carga lesional na substância branca e incapacidade, e sugerem que a atrofia cortical pode ocorrer mesmo nos pacientes com reduzido grau de incapacidade; a interrupção dos tratos da substância branca pelas placas parece contribuir, pelo menos parcialmente, para o desenvolvimento da atrofia cortical (394). Recentemente, foi demonstrado que a combinação das medidas de atrofia e

da carga lesional pela IRM podem prever a progressão clínica através do desenvolvimento de uma escala baseada na IRM (395).

5.2.2- Avaliação dos marcadores de neurodegeneração

A progressão clínica é patologicamente explicada pela neurodegeneração, mas os mecanismos envolvidos ainda não são bem conhecidos. A proteína Tau é considerada um marcador de dano axonal e a sua forma anormal hiperfosforilada está envolvida na etiopatogenia de algumas desordens neurodegenerativas. Alguns autores demonstraram a associação do acúmulo desta forma insolúvel da proteína Tau (P-Tau) com a progressão secundária da EM (396,397,398). Em nossa série foi verificado aumento dos níveis de proteína T-tau no LCR de pacientes EM, comparados com controles normais. Estes dados corroboram outros trabalhos que também mostraram elevação dos níveis de proteína T-tau e P-tau (178,179,180,181,182,183,184,185). Alguns autores mostraram um maior aumento de T-tau nas fases iniciais da EM (CIS) e na doença ativa quando comparados com estágios clínicos estáveis, mas não registraram elevação de P-tau (179,182,184,280). Em nosso estudo, não foi demonstrada elevação de P-tau em relação ao grupo controle saudável.

A observação de atrofia cerebral sem correlação com os parâmetros inflamatórios no LCR requer estudos adicionais para elucidar melhor o papel da resposta inflamatória na neurodegeneração. Nossos dados enfatizam a relação da síntese intratecal de anticorpos com a carga lesional cerebral em pacientes EM com a forma clínica remitente-recorrente. Alguns autores mostraram a associação dos níveis de T-tau com a carga de lesões em T2 e com a EDSS em pacientes com esta mesma forma clínica (181,280). A correlação de T-tau com o índice IgG, também foi observada, sugerindo a participação da inflamação, pelo menos em parte, no dano axonal na EM (180). No presente estudo, observamos aumento significativo das proteínas T-tau antes do tratamento, e importante diminuição após o tratamento com imunomodulador. Níveis aumentados destes marcadores foram associados com o grau de atrofia cerebral focal (regiões temporal, frontal, parietal e hipocampo) em pacientes idosos com doença de Alzheimer ou declínio cognitivo associado à idade (399), mas praticamente não existem estudos relacionando

estes marcadores com medidas de atrofia em pacientes com EM. Em nossa série, não foi observada associação das proteínas T-tau e P-tau com o volume cerebral na RM. Além disso, as características clínicas (EDSS, taxa de surtos), outras medidas quantitativas por IRM (volume total de lesões e número de placas) e parâmetros de inflamação no LCR (número de leucócitos, Índice IgG e Índice IgM) não influenciaram os níveis de T-tau e P-tau. Estes achados corroboram outros estudos que demonstraram resultados conflitantes, principalmente nos estágios iniciais da doença, sugerindo que estas proteínas não são úteis como marcadores de atividade e dano axonal para uso clínico de rotina (186,187,188,400).

Novas medidas quantitativas de IRM, parâmetros inflamatórios e marcadores de neurodegeneração no LCR poderão ser potenciais instrumentos para um melhor entendimento dos aspectos imunopatológicos da EM (189).

5.2.3- Avaliação clínica

O entendimento atual da patogênese da EM sugere que o dano axonal ocorre nos estágios iniciais da doença (381,401) e que o tratamento precoce pode prevenir ou retardar o desenvolvimento da incapacidade funcional (402,403,404). A forma clínica remittente-recorrente evolui para a forma progressiva secundária depois de um período muito variável. Acredita-se que a evolução ocorra como resultado da sobreposição do dano axonal progressivo, mas existe um subgrupo de pacientes que apresenta pouca ou nenhuma progressão ao longo do curso da doença (forma benigna). Alguns autores relatam que isto não é uma verdade absoluta e que alguns casos podem desenvolver doença progressiva (275). Em nossa série, somente 20% dos pacientes foram classificados como portadores da forma benigna e estão em concordância com outros estudos em pacientes brasileiros (4). O início da doença em faixas etárias mais jovens, sexo feminino, sintomas sensitivos e neurite óptica no início e poucos surtos nos primeiros dois anos estão associados com um curso favorável (405). Apesar destes estudos, ainda é muito difícil prever se o curso será benigno no início. A manutenção ou recuperação da condução neural dentro das lesões no SNC parece ser a essência da forma benigna (406). Estudos mais recentes sugerem que a

progressão da doença pode ser um processo degenerativo dependente da idade, independente de surtos prévios e que o curso inicial da doença não influencia substancialmente a idade de instalação da incapacidade (407,408).

5.3- Considerações finais

Os estudos de história natural da EM estabeleceram bem, de uma forma geral, a evolução e o prognóstico da doença. Apesar desta aparente homogeneidade do curso clínico, existe uma grande variabilidade individual que torna imprevisível a determinação do perfil individual (409).

Os resultados do presente estudo sugerem que o perfil clínico-laboratorial desta amostra de pacientes brasileiros não apresenta diferenças significativas comparados com estudos de outras populações com EMRR.

Com base nas análises laboratoriais e de neuroimagem, na avaliação evolutiva dos pacientes e na redução do volume cerebral observados em nossa série, desde os estágios iniciais da doença, nós podemos inferir que a população estudada não apresenta um perfil benigno e necessita de medidas efetivas de intervenção para controle do processo patológico.

6- CONCLUSÕES



6.1- Conclusões gerais

6.1.1- A avaliação dos parâmetros inflamatórios no LCR foi mais sensível que os dados clínicos (taxa anual de surtos e a EDSS) na demonstração de atividade da doença.

6.1.2- Apesar do tratamento com imunomodulador, os pacientes apresentaram piora progressiva do quadro clínico. Isto implica que o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento é fundamental para o controle da EM.

6.2- Conclusões específicas

6.2.1- A análise das citocinas demonstrou um perfil inflamatório nos pacientes EMRR mesmo em fase de remissão clínica.

6.2.2- A carga lesional nas imagens por ressonância magnética quantitativa apresentou correlação com a resposta de anticorpos IgG no LCR.

6.2.3- A síntese intratecal de IgM, presente nos pacientes EMRR em fase de remissão clínica, mostrou ser um marcador de atividade da doença.

6.2.4- Em nossa série foi detectada atrofia cerebral pela IRM nos estágios iniciais da doença, assim como aumento de proteínas T-tau no LCR. Estas medidas refletem o dano axonal precoce e apóiam os estudos que sugerem intervenção terapêutica na síndrome clínica isolada (CIS) de alto risco.

6.2.5- O tratamento com imunomodulador reduziu os níveis das proteínas T-tau no LCR, sugerindo a participação da inflamação no dano axonal.

6.2.6- Não foi possível estabelecer associação entre a presença de anticorpos do vírus EBV no LCR e a atividade da doença.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- 1 Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:683-747.
- 2 Dejong R. Multiple Sclerosis. History, definition and general considerations. In: Vinken PJ, Bruyn GW. *Handbook of Clinical Neurology. Multiple Sclerosis and other demyelinating diseases.* Amsterdam: Ed North-Holland Publishing Company, 1970. p. 45-62. v9.
- 3 Ross AP. Strategies for optimal disease management, adherence, and outcomes in multiple sclerosis patients. *Neurology.* 2008;71(24 Suppl 3):S1-2.
- 4 Moreira MA, Felipe E, Mendes MF, Tilbery CP. Multiple sclerosis: descriptive study of its clinical forms in 302 cases. *Arq Neuropsiquiatr.* 2000;58:460-6.
- 5 Arruda WO, Scola RH, Teive HA, Werneck LC. Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;59:165-70.
- 6 Ferreira ML, Machado MI, Vilela ML, Guedes MJ, Ataíde L Jr, Santos S, Laurentino SG. Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2004;62:1027-32.
- 7 Fragoso YD, Fiore AP. Description and characteristics of 81 patients attending the Reference Center for Multiple Sclerosis of the coastal region of the state of São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2005;63:741-4.
- 8 Anderson-Kuntz Grzesiuk. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá- Mato Grosso. *Arq Neuropsiquiatr* 2006;64:635-8.
- 9 Cardoso E, Fukuda T, Pereira J, Seixas J, Miranda R, Rodrigues B et al. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the State of Bahia, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64:727-30.

- 10 Eustáquio Claret dos Santos, Mítico Yokota, Nádia Fernanda Rezende Dias. Esclerose Múltipla. Estudo de pacientes com a forma surto-remissão cadastrados na Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. *Arq Neuropsiquiatr*. 2007;65:885-8.
- 11 Alves-Leon SV, Malfetano Fr, Pimentel ML, Estrada CL, Pereira VC, Liem AM et al. Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a Brazilian Cohort patients. *Arq Neuropsiquiatr*. 2008;66:671-7.
- 12 Callegaro D, de Lolio CA, Radvany J, Tilbery CP, Mendonça RA, Melo AC. Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1990. *Neuroepidemiology*. 1992;11:11-4.
- 13 Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand*. 2001;104:208-13.
- 14 Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 1975;51:137-57.
- 15 McLeod JG, Hammond SR, Hallpike JF. Epidemiology of multiple sclerosis in Australia. With NSW and SA survey results. *Med J Aust*. 1994;160:117-22.
- 16 Mertens C, Brassat D, Reboul J, Eichenbaum-Voline S, Vuillemin-Azais C, Cournu I et al. A systematic study of oligodendrocyte growth factors as candidates for genetic susceptibility to MS. French Multiple Sclerosis Genetics Group. *Neurology*. 1998;51:748-53.
- 17 Miller DH, Hammond SR, McLeod JG, Purdie G, Skegg DC. Multiple sclerosis in Australia and New Zealand: are the determinants genetic or environmental? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990;53:903-5.
- 18 Poser CM. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl 2:S231-43.
- 19 Sadovnick AD, Ebers GC. Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview. *Can J Neurol Sci*. 1993;20:17-29.

- 20 Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004;3:104-10.
- 21 Hillert J, Olerup O. HLA and MS. *Neurology*. 1993;43:2426-7.
- 22 Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmner JB, Martin ER et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet*. 1998;7:1229-34.
- 23 Stratmann T, Martin-Orozco N, Mallet-Designé V, Poirot L, McGavern D, Losyev G et al. Susceptible MHC alleles, not background genes, select an autoimmune T cell reactivity. *J Clin Invest*. 2003;112:902-14.
- 24 Wucherpfennig KW. The structural interactions between T cell receptors and MHC-peptide complexes place physical limits on self-nonsel discrimination. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;296:19-37.
- 25 Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet*. 2008;9:516-26.
- 26 Caballero A, Alvés-León S, Papais-Alvarenga R, Fernández O, Navarro G, Alonso A. DQB1*0602 confers genetic susceptibility to multiple sclerosis in Afro-Brazilians. *Tissue Antigens*. 1999;54:524-6.
- 27 Co0 H, Aronson KJ. A systematic review of several potential non-genetic risk factors for multiple sclerosis. *Neuroepidemiology*. 2004;23:1-12.
- 28 Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33:1444-52.
- 29 Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*. 1993;6:382-427. Erratum in: *Clin Microbiol Rev* 1994;7:141.
- 30 Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001;286:3083-8.

- 31 Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005;115:1352-60.
- 32 Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D et al. Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*. 2005;293:2536.
- 33 Pender MP. Preventing and curing multiple sclerosis by controlling Epstein-Barr virus infection. *Autoimmun Rev*. 2009;8:563-8.
- 34 Trojano M, Avolio C. Epstein-Barr virus (EBV) and multiple sclerosis association: EBV has a primary or secondary role? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:469.
- 35 Hauser SL, Johnston SC. Recombinant therapeutics: from bench to bedside (if your health plan concurs). *Ann Neurol*. 2006;60:10A-11A.
- 36 Fredrikson S, Michelsberg J, Hillert J, Wang Z, Sun JB, Olerup O et al. Conjugal multiple sclerosis: immunogenetic characterization and analysis of T- and B-cell reactivity to myelin proteins. *Neurology*. 1992;42:577-82.
- 37 Cantorna MT. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutr Rev*. 2008;66 (Suppl 2):S135-8.
- 38 Kampman MT, Brustad M. Vitamin D: a candidate for the environmental effect in multiple sclerosis- observations from Norway. *Neuroepidemiology*. 2008;30:140-6.
- 39 Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52:61-76.
- 40 Bour-Jordan H, Bluestone JA. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev*. 2009;229:41-66.
- 41 Sanjabi S, Zenewicz LA, Kamanaka M, Flavell RA. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;29.

- 42 Pelfrey CM, Tranquill LR, Boehme SA, McFarland HF, Lenardo MJ. Two mechanisms of antigen-specific apoptosis of myelin basic protein (MBP)-specific T lymphocytes derived from multiple sclerosis patients and normal individuals. *J Immunol.* 1995;154:6191-202.
- 43 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell.* 1991;66:233-43.
- 44 Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C et al. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem.* 1992;267:10709-15.
- 45 Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell.* 1993;75:1169-78.
- 46 Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 2009;30:180-92.
- 47 Friedline RH, Brown DS, Nguyen H, Kornfeld H, Lee J, Zhang Y, Appleby M, Der SD, Kang J, Chambers CA. CD4⁺ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance. *J Exp Med.* 2009;206:721.
- 48 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986;136:2348-57.
- 49 Carrier Y, Yuan J, Kuchroo VK, Weiner HL. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J Immunol.* 2007;178:179-85.
- 50 Korn T, Mitsdoerffer M, Kuchroo VK. Immunological Basis for the Development of Tissue Inflammation and Organ-Specific Autoimmunity in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Results Probl Cell Differ.* 2009;23.

- 51 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2006;5:179-90.
- 52 Bettelli E. Building different mouse models for human MS. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1103:11-8..
- 53 Brahmachari S, Pahan K. Role of cytokine p40 family in multiple sclerosis. *Minerva Med*. 2008;99:105-18.
- 54 Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology*. 2008;125:161-9.
- 55 Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S et al. IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis. *Gene Ther*. 2008;15:504-15.
- 56 Gershon RK, Kondo K. Degeneracy of the immune response to sheep red cells. *Immunology*. 1972;23:321-34.
- 57 Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 2001;3:947-54.
- 58 Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med*. 1996;184:19-29.
- 59 Groux H, Sornasse T, Cottrez F, de Vries JE, Coffman RL, Roncarolo MG et al. Induction of human T helper cell type 1 differentiation results in loss of IFN-gamma receptor beta-chain expression. *J Immunol*. 1997;158:5627-31.
- 60 Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med*. 2001;193:F5-9.
- 61 Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M et al. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev*. 2001;182:18-32.

- 62 Schorle H, Holtschke T, Hünig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*. 1991;352:621-4.
- 63 Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 1993;75:253-61.
- 64 Sadlack B, Löhler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol*. 1995;25:3053-9.
- 65 Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 1995;3:521-30.
- 66 Suzuki H, Kündig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*. 1995;268:1472-6.
- 67 Suzuki H, Zhou YW, Kato M, Mak TW, Nakashima I. Normal regulatory alpha/beta T cells effectively eliminate abnormally activated T cells lacking the interleukin 2 receptor beta in vivo. *J Exp Med*. 1999;190:1561-72.
- 68 Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005;201:723-35.
- 69 Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med*. 2002;196:851-7.
- 70 Sakaguchi S, Sakaguchi N. Regulatory T cells in immunologic self-tolerance and autoimmune disease. *Int Rev Immunol*. 2005;24:211-26.
- 71 Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;199:971-9.

- 72 Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998;188:287-96.
- 73 Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000;192:303-10.
- 74 Read S, Malmström V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med.* 2000;192:295-302.
- 75 Shevach EM, McHugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells. *Immunol Rev.* 2001;182:58-67.
- 76 Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:389-400.
- 77 Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H et al. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med.* 2002;196:237-46.
- 78 Wilczynski JR, Radwan M, Kalinka J. The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 2008;13:2266-74.
- 79 Annacker O, Pimenta-Araujo R, Buren-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol.* 2001;166:3008-18.
- 80 Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 2001;194:629-44.
- 81 Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004;172:834-42.

- 82 Huynh W, Cordato DJ, Kehdi E, Masters LT, Dedousis C. Post-vaccination encephalomyelitis: literature review and illustrative case. *J Clin Neurosci.* 2008;15:1315-22.
- 83 Ben-Nun A, Cohen IR. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J Immunol.* 1982;129:303-8.
- 84 Holoshitz J, Frenkel A, Ben-Nun A, Cohen IR. Autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by T lymphocyte lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinant specific. *J Immunol.* 1983;131:2810-3.
- 85 Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 1992;176:1355-64.
- 86 Kuchroo VK, Martin CA, Greer JM, Ju ST, Sobel RA, Dorf ME. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediate experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol.* 1993;151:4371-82.
- 87 Farias AS, de la Hoz C, Castro FR, Oliveira EC, Ribeiro dos Reis JR, Silva JS, Langone F, Santos LM. Nitric oxide and TNFalpha effects in experimental autoimmune encephalomyelitis demyelination. *Neuroimmunomodulation.* 2007;14:32-8.
- 88 Xiao BG, Ma CG, Xu LY, Link H, Lu CZ. IL-12/IFN-gamma/NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol.* 2008;45:1191-6.
- 89 Heremans H, Dillen C, Groenen M, Martens E, Billiau A. Chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) in mice: enhancement by monoclonal antibodies against interferon-gamma. *Eur J Immunol.* 1996;26:2393-8.

- 90 Hofstetter H, Gold R, Hartung HP. Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J.* 2009;16:12-8.
- 91 Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA. FN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1996;157:3223-7.
- 92 Murugaiyan G, Mittal A, Weiner HL. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2008;181:7480-8.
- 93 Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008;453:1051-7.
- 94 Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-8.
- 95 Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, Akimzhanov A, Kang HS, Chung Y et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. *Immunity.* 2008;28:29-39.
- 96 Korn T, Oukka M, Kuchroo V, Bettelli E. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin Immunol.* 2007;19:362-71.
- 97 Thakker P, Leach MW, Kuang W, Benoit SE, Leonard JP, Marusic S. IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;178:2589-98.
- 98 Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008;28:454-67.
- 99 Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang GX, Rostami A. Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;179:3268-75.

- 100 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
- 101 Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *Immunol.* 1998;161:3299-306.
- 102 Jander S, Pohl J, D'Urso D, Gillen C, Stoll G. Time course and cellular localization of interleukin-10 mRNA and protein expression in autoimmune inflammation of the rat central nervous system. *Am J Pathol.* 1998;152:975-82.
- 103 Cua DJ, Hutchins B, LaFace DM, Stohlman SA, Coffman RL. Central nervous system expression of IL-10 inhibits autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2001;166:602-8.
- 104 Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3:944-50.
- 105 Hafler DA, Weiner HL. MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunol Today.* 1989;10:104-7.
- 106 Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature.* 1990;346:183-7.
- 107 Hallal-Longo DE, Mirandola SR, Oliveira EC, Farias AS, Pereira FG, Metze IL et al. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res.* 2007;27:865-73.
- 108 Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:351-8.
- 109 Lemke H, Lange H. Childhood infections and autoimmune diseases. *N Engl J Med.* 2002;346:1749-50.

- 110 Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995;80:695-705.
- 111 Stinissen P, Raus J, Zhang J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol*. 1997;17:33-75.
- 112 Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol*. 2009;65:239-48.
- 113 Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*. 1989;59:1203-11.
- 114 Faruqi RM, DiCorleto PE. Mechanisms of monocyte recruitment and accumulation. *Br Heart J*. 1993;69(1 Suppl):S19-29.
- 115 Washington R, Burton J, Todd RF 3rd, Newman W, Dragovic L, Dore-Duffy P. Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1994;35:89-97.
- 116 Wildner O, Lipkow T, Knop J. Increased expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by cultured human endothelial cells upon exposure to haptens. *Exp Dermatol*. 1992;1:191-8.
- 117 Raine CS, Lee SC, Scheinberg LC, Duijvestin AM, Cross AH. Adhesion molecules on endothelial cells in the central nervous system: an emerging area in the neuroimmunology of multiple sclerosis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990;57:173-87.
- 118 Dore-Duffy P, Newman W, Balabanov R, Lisak RP, Mainolfi E, Rothlein R et al. Circulating, soluble adhesion proteins in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis: correlation with clinical activity. *Ann Neurol*. 1995;37:55-62.

- 119 Sharief MK, Noori MA, Ciardi M, Cirelli A, Thompson EJ. Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *J Neuroimmunol.* 1993;43:15-21.
- 120 Jander S, Heidenreich F, Stoll G. Serum and CSF levels of soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in inflammatory neurologic diseases. *Neurology.* 1993;43:1809-13.
- 121 Rieckmann P, Martin S, Weichselbraun I, Albrecht M, Kitze B, Weber T et al. Serial analysis of circulating adhesion molecules and TNF receptor in serum from patients with multiple sclerosis: cICAM-1 is an indicator for relapse. *Neurology.* 1994;44:2367-72.
- 122 Brocke S, Veromaa T, Weissman IL, Gijbels K, Steinman L. Infection and multiple sclerosis: a possible role for superantigens? *Trends Microbiol.* 1994;2:250-4.
- 123 Gijbels K, Masure S, Carton H, Opdenakker G. Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol.* 1992;41:29-34.
- 124 Steinman RM, Bonifaz L, Fujii S, Liu K, Bonnyay D, Yamazaki S, Pack M, Hawiger D, Iyoda T, Inaba K, Nussenzweig MC. The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2005;560:83-97.
- 125 Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol.* 1996;24:859-62.
- 126 Dantzer R. How do cytokines say hello to the brain? Neural versus humoral mediation. *Eur Cytokine Netw.* 1994;5:271-3.
- 127 Woodroffe MN. Cytokine production in the central nervous system. *Neurology.* 1995;45(Suppl 6):S6-10.
- 128 Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol.* 1994;152:2720-8.

- 129 Constam DB, Philipp J, Malipiero UV, ten Dijke P, Schachner M, Fontana A. Differential expression of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 by glioblastoma cells, astrocytes, and microglia. *J Immunol.* 1992;148:1404-10.
- 130 Woodroffe MN, Sarna GS, Wadhwa M, Hayes GM, Loughlin AJ, Tinker A, Cuzner ML. Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by in vivo microdialysis: evidence of a role for microglia in cytokine production. *J Neuroimmunol.* 1991;33:227-36.
- 131 Panitch HS, Bever CT Jr. Clinical trials of interferons in multiple sclerosis. What have we learned? *J Neuroimmunol.* 1993;46:155-64.
- 132 Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 1996;45:322-33.
- 133 Chofflon M, Fellay B. Monitoring multiple sclerosis course and activity with TNF-alpha. *Mult Scler.*;4:188-92.
- 134 Alves-Leon SV, Batista E, Papais-Alvarenga R, Quírico-Santos T. Determination of soluble ICAM-1 and TNFalphaR in the cerebrospinal fluid and serum levels in a population of Brazilian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001;59:18-22.
- 135 Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999;5:101-4.
- 136 Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002;8:500-8.
- 137 Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol.* 2006;176:7768-74. Erratum in: *J Immunol.* 2006;177:2025.

- 138 Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX. Inducible IL-23p19 expression in human microglia via p38 MAPK and NF-kappaB signal pathways. *Exp Mol Pathol*. 2008;84:1-8.
- 139 Lucas K, Hohlfeld R. Differential aspects of cytokines in the immunopathology of multiple sclerosis. *Neurology*. 1995;45(6 Suppl 6):S4-5.
- 140 Mokhtarian F, Shi Y, Shirazian D, Morgante L, Miller A, Grob D. Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. *J Immunol*. 1994;152:6003-10.
- 141 Rollnik JD, Sindern E, Schweppe C, Malin JP. Biologically active TGF-beta 1 is increased in cerebrospinal fluid while it is reduced in serum in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 1997;96:101-5.
- 142 Höftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M et al. Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol*. 2004;14:43-50.
- 143 Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol*. 1983;4:201-21.
- 144 Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA et al. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*. 2004;103:4222-31.
- 145 Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R et al. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000;192:393-404.
- 146 Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A et al. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:11064-9.

- 147 Zhang Y, Da RR, Hilgenberg LG, Tourtellotte WW, Sobel RA, Smith MA et al. Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 2005;167:120-30.
- 148 Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999;5:170-5.
- 149 O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA et al. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol*. 2005;175:1974-82.
- 150 Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:897-902.
- 151 Moulin D, Paty DW, Ebers GC. The predictive value of cerebrospinal fluid electrophoresis in 'possible' multiple sclerosis. *Brain*. 1983;106:809-16.
- 152 Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM et al. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2002;105:158-63.
- 153 Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1998;4:127-31.
- 154 Frequin ST, Barkhof F, Lamers KJ, Hommes OR, Borm GF. CSF myelin basic protein, IgG and IgM levels in 101 MS patients before and after treatment with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand*. 1992;86:291-7.
- 155 Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E et al. *Neurology*. 2002;59:555-9.
- 156 Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E et al. Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology*. 2002;58:824-6.

- 157 Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:953-5.
- 158 Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:852-8.
- 159 Simpson BS, Coles AJ. Rationale for cytotoxic monoclonal antibodies in MS. *Int MS J*. 2007;14:48-56.
- 160 Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358:676-88.
- 161 Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1998;338:278-85.
- 162 Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain*. 2000;123:1174-83.
- 163 McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8:913-9.
- 164 Kornek B, Storch MK, Weissert R, Wallstroem E, Stefferl A, Olsson T et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol*. 2000;157:267-76.
- 165 Neumann H. Molecular mechanisms of axonal damage in inflammatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol*. 2003;16:267-73.
- 166 Zhang Y, Da RR, Hilgenberg LG, Tourtellotte WW, Sobel RA, Smith MA et al. Clonal expansion of IgA-positive plasma cells and axon-reactive antibodies in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 2005;167:120-30.
- 167 Lassmann H. Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:695-7.

- 168 Acar G, Idiman F, Idiman E, Kirkali G, Cakmakçi H, Ozakbaş S. Nitric oxide as an activity marker in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2003;250:588-92.
- 169 Bechtold DA, Smith KJ. Sodium-mediated axonal degeneration in inflammatory demyelinating disease. *J Neurol Sci*. 2005;233:27-35.
- 170 Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*. 2004;7:613-20.
- 171 Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci*. 2001;4:702-10.
- 172 Salter MG, Fern R. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*. 2005;438:1167-71.
- 173 Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*. 2005;438:1162-6.
- 174 Frohman EM, Filippi M, Stuve O, Waxman SG, Corboy J, Phillips JT et al. Characterizing the mechanisms of progression in multiple sclerosis: evidence and new hypotheses for future directions. *Arch Neurol*. 2005;62:1345-56.
- 175 Dutta R, Trapp BD. Pathology and definition of multiple sclerosis. *Rev Prat*. 2006;56:1293-8.
- 176 Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2000;48:893-901.
- 177 Delacourte A. Pathological Tau proteins of Alzheimer's disease as a biochemical marker of neurofibrillary degeneration. *Biomed Pharmacother*. 1994;48:287-95.
- 178 Kapaki E, Paraskevas GP, Michalopoulou M, Kilidireas K. Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 2000;43:228-32.

- 179 Süssmuth SD, Reiber H, Tumani H. Tau protein in cerebrospinal fluid (CSF): a blood-CSF barrier related evaluation in patients with various neurological diseases. *Neurosci Lett*. 2001;300:95-8.
- 180 Bartosik-Psujek H, Archelos JJ. Tau protein and 14-3-3 are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and correlate with intrathecal synthesis of IgG. *J Neurol*. 2004;251:414-20.
- 181 Martínez-Yélamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2004;363:14-7.
- 182 Brettschneider J, Maier M, Arda S, Claus A, Süssmuth SD, Kassubek J et al. Tau protein level in cerebrospinal fluid is increased in patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005;11:261-5.
- 183 Rostasy K, Withut E, Pohl D, Lange P, Ciesielcyk B, Diem R et al. Tau, phospho-tau, and S-100B in the cerebrospinal fluid of children with multiple sclerosis. *J Child Neurol*. 2005;20:822-5.
- 184 Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neural Transm*. 2006;113:339-45.
- 185 Terzi M, Birinci A, Cetinkaya E, Onar MK. Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2007;115:325-30.
- 186 Guimarães I, Cardoso MI, Sá MJ. Tau protein seems not to be a useful routine clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2006;12:354-6.
- 187 Hein Née Maier K, Köhler A, Diem R, Sättler MB, Demmer I, Lange P et al. Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2008;436:72-6.
- 188 Valis M, Talab R, Stourac P, Andrys C, Masopust J. Tau protein, phosphorylated tau protein and beta-amyloid42 in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29:971-6.

189 Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJ et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;72:1322-9.

190 Kerschensteiner M, Bareyre FM, Buddeberg BS, Merkler D, Stadelmann C, Bruck W et al. Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2004;200:1027-38.

191 Marques KB, Santos LM, Oliveira AL. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci*. 2006;24:3053-62.

192 Marques KB, Scorisa JM, Zanon R, Freria CM, Santos LMB, Damasceno BP et al. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42:01-10.

193 Scorisa JM, Zanon RG, Freria CM, Oliveira AL. Glatiramer acetate positively influences spinal motoneuron survival and synaptic plasticity after ventral root avulsion. *Neurosci Lett*. 2009;451:34-9.

194 Filippi M, Agosta F. Magnetic resonance techniques to quantify tissue damage, tissue repair, and functional cortical reorganization in multiple sclerosis. Elsevier: Eds J. Verhaagen et al., 2009. p.465-82. v175.

195 Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989;112:133-46.

196 Noseworthy JH, Gold R, Hartung HP. Treatment of multiple sclerosis: recent trials and future perspectives. *Curr Opin Neurol*. 1999;12:279-93.

197 Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46:907-11.

198 Lauer K, Firnhaber W. Epidemiological investigations into multiple sclerosis in Southern Hesse. V. Course and prognosis. *Acta Neurol Scand*. 1987;76:12-7.

- 199 Benedikz J, Stefánsson M, Guomundsson J, Jónasdóttir A, Fossdal R, Gulcher J et al. The natural history of untreated multiple sclerosis in Iceland. A total population-based 50 year prospective study. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002;104:208-10.
- 200 Kalanie H, Gharagozli K, Kalanie AR. Multiple sclerosis: report on 200 cases from Iran. *Mult Scler.* 2003;9:36-8.
- 201 Perini P, Tagliaferri C, Belloni M, Biasi G, Gallo P. The HLA-DR13 haplotype is associated with "benign" multiple sclerosis in northeast Italy. *Neurology.* 2001;57:158-9.
- 202 Ramsaransing GS, De Keyser J. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta Neurol Scand.* 2006;113:359-69.
- 203 Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler.* 1998;4:93-8.
- 204 Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000;47:707-17.
- 205 Rodriguez M, Scheithauer B. Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastruct Pathol.* 1994;18:3-13.
- 206 Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol.* 2004;55:458-68.
- 207 Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R et al. Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2008;63:16-25.
- 208 Barnes D, Munro PM, Youl BD, Prineas JW, McDonald WI. The longstanding MS lesion. A quantitative MRI and electron microscopic study. *Brain.* 1991;114:1271-80.
- 209 Raine CS. Multiple sclerosis: a pivotal role for the T cell in lesion development. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1991;17:265-74.

- 210 Wolswijk G. Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci*. 1998;18:601-9.
- 211 Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mørk SJ. Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Mult Scler*. 2003;9:323-31.
- 212 Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F et al. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;122:552-68.
- 213 Andersson M, Alvarez-Cermeño J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, Fredrikson S, Gallo P, Grimaldi LM, Grønning M, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994;57:897-902.
- 214 Puccioni-Sohler M, Passeri F, Oliveira C, Brandão CO, Papaiz-Alvarenga R. Multiple sclerosis in Brazil. Analysis of cerebrospinal fluid by standard methods. *Arq Neuropsiquiatr*. 1999;57:927-31.
- 215 Puccioni-Sohler M, Lavrado FP, Bastos RR, Brandão CO, Papaiz-Alvarenga R. Multiple sclerosis: clinical and laboratorial correlation. *Arq Neuropsiquiatr*. 2001;59:89-91.
- 216 Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997;120:2059-69.
- 217 McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121-7.
- 218 Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Rio J, Díaz-Villoslada P, Brieua L, Borrás C, Grivé E, Capellades J, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:702-6.

219 Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58:840-6.

220 Thompson AJ, Montalban X, Barkhof F, Brochet B, Filippi M, Miller DH et al. Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol*. 2000;47:831-5.

221 Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, Ohman S, Racke MK, Sharief M, Sindic CJ, Sellebjerg F, Tourtellotte WW.

Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. : *Arch Neurol*. 2005;62:865-70.

222 Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, Hashimoto SA, Hooge JP, Eisen AA et al. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology*. 1988;38:180-5.

223 Nesbit GM, Forbes GS, Scheithauer BW, Okazaki H, Rodriguez M. Multiple sclerosis: histopathologic and MR and/or CT correlation in 37 cases at biopsy and three cases at autopsy. *Radiology*. 1991;180:467-74.

224 Yetkin FZ, Haughton VM, Papke RA, Fischer ME, Rao SM. Multiple sclerosis: specificity of MR for diagnosis. *Radiology*. 1991;178:447-51.

225 Gean-Marton AD, Vezina LG, Marton KI, Stimac GK, Peyster RG, Taveras JM et al. Abnormal corpus callosum: a sensitive and specific indicator of multiple sclerosis. *Radiology*. 1991;180:215-21.

226 Thompson AJ, Kermode AG, Moseley IF, MacManus DG, McDonald WI. Seizures due to multiple sclerosis: seven patients with MRI correlations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1993;56:1317-20.

227 Moriarty DM, Blackshaw AJ, Talbot PR, Griffiths HL, Snowden JS, Hillier VF, Capener S, Laitt RD, Jackson A. Memory dysfunction in multiple sclerosis corresponds to juxtacortical lesion load on fast fluid-attenuated inversion-recovery MR images. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999;20:1956-62.

- 228 Lazeron RH, Langdon DW, Filippi M, van Waesberghe JH, Stevenson VL, Boringa JB, Origgi D, Thompson AJ, Falautano M, Polman CH, Barkhof F. Neuropsychological impairment in multiple sclerosis patients: the role of juxtacortical lesion on FLAIR. *Mult Scler.* 2000;6:280-5.
- 229 Rovaris M, Filippi M. MRI correlates of cognitive dysfunction in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2000;6 Suppl 2:S172-5.
- 230 Feinstein A. The neuropsychiatry of multiple sclerosis. *Can J Psychiatry.* 2004;49:157-63.
- 231 Miller DH. Guidelines for MRI monitoring of the treatment of multiple sclerosis: recommendations of the US Multiple Sclerosis Society's task force. *Mult Scler.* 1996;1:335-8.
- 232 Gadea M, Martínez-Bisbal MC, Marti-Bonmatí L, Espert R, Casanova B, Coret F, Celda B. Spectroscopic axonal damage of the right locus coeruleus relates to selective attention impairment in early stage relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 2004;127:89-98.
- 233 Dousset V, Brochet B, Vital A, Gross C, Benazzouz A, Boullerne A et al. Lysolecithin-induced demyelination in primates: preliminary in vivo study with MR and magnetization transfer. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1995;16:225-31.
- 234 Campi A, Filippi M, Comi G, Scotti G, Gerevini S, Dousset V. Magnetisation transfer ratios of contrast-enhancing and nonenhancing lesions in multiple sclerosis. *Neuroradiology.* 1996;38:115-9.
- 235 Chard DT, Griffin CM, McLean MA, Kapeller P, Kapoor R, Thompson AJ et al. Brain metabolite changes in cortical grey and normal-appearing white matter in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain.* 2002;125:2342-52.
- 236 Pagani E, Rocca MA, Gallo A, Rovaris M, Martinelli V, Comi G et al. Regional brain atrophy evolves differently in patients with multiple sclerosis according to clinical phenotype. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2005;26:341-6.

- 237 Cader S, Cifelli A, Abu-Omar Y, Palace J, Matthews PM. Reduced brain functional reserve and altered functional connectivity in patients with multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129:527-37.
- 238 Filippi M, Campi A, Dousset V, Baratti C, Martinelli V, Canal N, Scotti G, Comi G. A magnetization transfer imaging study of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology*. 1995;45:478-82.
- 239 Dousset V, Grossman RI, Ramer KN, Schnall MD, Young LH, Gonzalez-Scarano F, Lavi E, Cohen JA. Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: lesion characterization with magnetization transfer imaging. *Radiology*. 1992;182:483-91.
- 240 Loevner LA, Grossman RI, Cohen JA, Lexa FJ, Kessler D, Kolson DL. Microscopic disease in normal-appearing white matter on conventional MR images in patients with multiple sclerosis: assessment with magnetization-transfer measurements. *Radiology*. 1995;196:511-5.
- 241 Lexa FJ, Grossman RI, Rosenquist AC. Dyke Award paper. MR of wallerian degeneration in the feline visual system: characterization by magnetization transfer rate with histopathologic correlation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1994;15:201-12.
- 242 Le Bihan D. Molecular diffusion nuclear magnetic resonance imaging. *Magn Reson Q*. 1991;7:1-30.
- 243 Le Bihan D. Molecular diffusion, tissue microdynamics and microstructure. *NMR Biomed*. 1995;8:375-86.
- 244 Werring DJ, Clark CA, Barker GJ, Thompson AJ, Miller DH. Diffusion tensor imaging of lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Neurology*. 1999;52:1626-32.
- 245 Miller DH. Magnetic resonance imaging and spectroscopy in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 1995;8:210-5.
- 246 Miller DH, Austin SJ, Connelly A, Youl BD, Gadian DG, McDonald WI. Proton magnetic resonance spectroscopy of an acute and chronic lesion in multiple sclerosis. *Lancet*. 1991;337:58-9.

247 Arnold DL, Matthews PM, Francis GS, O'Connor J, Antel JP. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging for metabolic characterization of demyelinating plaques. *Ann Neurol*. 1992;31:235-41.

248 Wolinsky JS, Narayana PA, Doyle TJ, Lindey JW. Pathological mechanisms in CNS demyelination: as gleaned by serial magnetic resonance imaging of multiple sclerosis. I: Abramsky O, ed. *Frontiers in multiple sclerosis: clinical research and therapy*. London: ed. Martin Dumitz, 1997.pp.87-95.

249 Davie CA, Hawkins CP, Barker GJ, Brennan A, Tofts PS, Miller DH, McDonald WI. Serial proton magnetic resonance spectroscopy in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*. 1994;117:49-58.

250 Ford CC, Ceckler TL, Karp J, Herndon RM. Magnetic resonance imaging of experimental demyelinating lesions. *Magn Reson Med*. 1990;14:461-81.

251 Zivadinov R, Stosic M, Cox JL, Ramasamy DP, Dwyer MG. The place of conventional MRI and newly emerging MRI techniques in monitoring different aspects of treatment outcome. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 1:61-74.

252 Tselis AC, Lisak RP. Multiple sclerosis: therapeutic update. *Arch Neurol*. 1999;56:277-80.

253 Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD et al; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology*. 2002;58(2):169-78. Erratum in: *Neurology* 2002;59(3):480. Erratum in: *Neurology* 2002;59:480.

254 DeAngelis T, Lublin F. Multiple sclerosis: new treatment trials and emerging therapeutic targets. *Curr Opin Neurol*. 2008;21:261-71.

255 Linker RA, Kieseier BC, Gold R. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29:558-65.

- 256 Stüve O, Bennett JL, Hemmer B, Wiendl H, Racke MK, Bar-Or A, et al. Pharmacological treatment of early multiple sclerosis. *Drugs*. 2008;68:73-83.
- 257 Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995;45:1268-76.
- 258 Miller A, Shapiro S, Gershtein R, Kinarty A, Rawashdeh H, Honigman S et al. Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J Neuroimmunol*. 1998;92:113-21.
- 259 Gold R. Combination therapies in multiple sclerosis. *J Neurol*. 2008;255 Suppl 1:51-60.
- 260 Ramtahal J, Jacob A, Das K, Boggild M. Sequential maintenance treatment with glatiramer acetate after mitoxantrone is safe and can limit exposure to immunosuppression in very active, relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol*. 2006;253:1160-4.
- 261_PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology*. 2001 Jun 26;56(12):1628-36.
- 262 Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernández O, Hartung H, Seeldrayers P, Sørensen PS, Rovaris M, Martinelli V, Hommes OR; Early Treatment of Multiple Sclerosis Study Group.
- 263 Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW, and the CHAMPS Study Group. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343:898-904.
- 264 Kinkel RP, Kollman C, O'Connor P, Murray TJ, Simon J, Arnold D et al. CHAMPIONS Study Group. IM interferon beta-1a delays definite multiple sclerosis 5 years after a first demyelinating event. *Neurology*. 2006;66:678-84.

- 265 Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH et al. BENEFIT Study Group. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. *Lancet*. 2007;370:389-97.
- 266 Thompson AJ. Progress in neurorehabilitation in multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2002;15:267-70.
- 267 O'Connor P, Comi G, Montalban X, Antel J, Radue EW, de Vera A et al. FTY720 D2201 Study Group. Oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis: two-year results of a phase II extension study. *Neurology*. 2009;72:73-9.
- 268 Lee DH, Linker RA, Gold R. Spotlight on fumarates. *Int MS J*. 2008;15:12-8.
- 269 Leist TP, Vermersch P. The potential role for cladribine in the treatment of multiple sclerosis: clinical experience and development of an oral tablet formulation. *Curr Med Res Opin*. 2007;23:2667-76.
- 270 Tallantyre E, Evangelou N, Constantinescu CS. Spotlight on teriflunomide. *Int MS J*. 2008;15:62-8.
- 271 Zhang X, Markovic-Plese S. Statins' immunomodulatory potential against Th17 cell-mediated autoimmune response. *Immunol Res*. 2008;41:165-74.
- 272 Rose JW, Foley JF, Carlson NG. Monoclonal antibody treatments for multiple sclerosis. *Curr Treat Options Neurol*. 2009;11:211-20.
- 273 Fukaura H, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Hafler DA. Induction of circulating myelin basic protein and proteolipid protein-specific transforming growth factor-beta1-secreting Th3 T cells by oral administration of myelin in multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*. 1996;98:70-7.
- 274 Kantarci OH, Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin*. 2005;23:17-38.
- 275 Thompson AJ. Benign multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1999;67:138.

- 276 Fazekas F, Barkhof F, Filippi M, Grossman RI, Li DK, McDonald WI et al. The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology*. 1999;53:448-56.
- 277 Thompson AJ, Miller D, Youl B, MacManus D, Moore S, Kingsley D et al. Serial gadolinium-enhanced MRI in relapsing/remitting multiple sclerosis of varying disease duration. *Neurology*. 1992;42:60-3.
- 278 Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, Moseley IF et al. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging study. *BMJ*. 1990;300:631-4.
- 279 Kappos L, Moeri D, Radue EW, Schoetzau A, Schweikert K, Barkhof F et al. Predictive value of gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging for relapse rate and changes in disability or impairment in multiple sclerosis: a meta-analysis. *Gadolinium MRI Meta-analysis Group. Lancet*. 1999;353:964-9.
- 280 Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2006;12:143-8.
- 281 Nijeholt GJ, van Walderveen MA, Castelijns JA, van Waesberghe JH, Polman C, Scheltens P et al. Brain and spinal cord abnormalities in multiple sclerosis. Correlation between MRI parameters, clinical subtypes and symptoms. *Brain*. 1998;121:687-97.
- 282 Hohol MJ, Guttmann CR, Orav J, Mackin GA, Kikinis R, Khoury SJ et al. Serial neuropsychological assessment and magnetic resonance imaging analysis in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 1997;54:1018-25.
- 283 Rudick RA, Cutter G, Reingold S. The multiple sclerosis functional composite: a new clinical outcome measure for multiple sclerosis trials. *Mult Scler*. 2002;8:359-65.
- 284 Kalkers NF, Bergers L, de Groot V, Lazeron RH, van Walderveen MA, Uitdehaag BM et al. Concurrent validity of the MS Functional Composite using MRI as a biological disease marker. *Neurology*. 2001;56:215-9.

- 285 Rudick RA, Cutter G, Baier M, Fisher E, Dougherty D, Weinstock-Guttman B et al. Use of the Multiple Sclerosis Functional Composite to predict disability in relapsing MS. *Neurology*. 2001;56:1324-30.
- 286 Filippi M, Rovaris M, Comi G. Magnetic resonance in monitoring the natural history of multiple sclerosis and the effects of treatment. *Ital J Neurol Sci*. 1996;17:385-91.
- 287 Simon JH, Lull J, Jacobs LD, Rudick RA, Cookfair DL, Herndon RM, A longitudinal study of T1 hypointense lesions in relapsing MS: MSCRG trial of interferon beta-1a. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Neurology*. 2000;55:185-92.
- 288 Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, Lassmann H, Lucchinetti C, Brück W. A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol*. 2001;49:793-6.
- 289 Fox NC, Jenkins R, Leary SM, Stevenson VL, Losseff NA, Crum WR, Progressive cerebral atrophy in MS: a serial study using registered, volumetric MRI. *Neurology*. 2000;54:807-12.
- 290 Fu L, Matthews PM, De Stefano N, Worsley KJ, Narayanan S, Francis GS, Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain*. 1998;121:103-13.
- 291 Sternberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem*. 1977;23:1456-64.
- 292 Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta*. 1987;163:319-28.
- 293 Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977;37:397-401.
- 294 Olsson JE, Pettersson B. A comparison between agar gel electrophoresis and CSF serum quotients of IgG and albumin in neurological disease. *Acta Neurol Scand*. 1976;53:308-22.

- 295 Forsberg P, Henriksson A, Link H, Ohman S. Reference values for CSF-IgM, CSF-IgM/S-IgM ratio and IgM index, and its application to patients with multiple sclerosis and aseptic meningoencephalitis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1984;44:7-12.
- 296 Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, van de Voorde A, Martin JJ et al. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem*. 1993;61:1828-34.
- 297 Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Van Kerschaver E, Van Der Perre B, Sjögren M et al. Quantification of tau phosphorylated at threonine 181 in human cerebrospinal fluid: a sandwich ELISA with a synthetic phosphopeptide for standardization. *Neurosci Lett*. 2000;285:49-52.
- 298 Vanderstichele H, Van Kerschaver E, Hesse C, Davidsson P, Buyse MA, Andreasen N et al. Standardization of measurement of beta-amyloid(1-42) in cerebrospinal fluid and plasma. *Amyloid*. 2000;7:245-58.
- 299 Sjögren M, Vanderstichele H, Agren H, Zachrisson O, Edsbacke M, Wikkelso C et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem*. 2001;47:1776-81.
- 300 Andreasen N, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Davidsson P, Blennow K. Cerebrospinal fluid levels of total-tau, phospho-tau and A beta 42 predicts development of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. *Acta Neurol Scand*. 2003;179:47-51.
- 301 Hampel H, Buerger K, Zinkowski R, Teipel SJ, Goernitz A, Andreasen N et al. Measurement of phosphorylated tau epitopes in the differential diagnosis of Alzheimer disease: a comparative cerebrospinal fluid study. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:95-102.
- 302 Vanderstichele H, De Vreese K, Blennow K, Andreasen N, Sindic C, Ivanoiu A et al. Analytical performance and clinical utility of the INNOTEST PHOSPHO-TAU181P assay for discrimination between Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44:1472-80.

- 303 Rondina JM, Cendes F, Lotufo RA: Desenvolvimento de um sistema semi-automático para a segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética. Anais CBIS – VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde, 2002.
- 304 Beucher S, Lantuéjoul C: Use of watersheds in contour detection. International Workshop on Image Processing, Real-Time Edge and Motion Detection/Estimation, Rennes, 1979 22 Dougherty E, Lotufo R: Hands-on Morphological Image Processing. Bellingham, SPIE Press, 2003.
- 305 Filippi M, Mastronardo G, Rocca MA, Pereira C, Comi G. Quantitative volumetric analysis of brain magnetic resonance imaging from patients with multiple sclerosis. J Neurol Sci. 1998;158:148-53.
- 306 Miller DH. MRI monitoring of MS in clinical trials. Clin Neurol Neurosurg. 2002;104:236-43.
- 307 Tedeschi G, Gallo A. Multiple sclerosis patients and immunomodulation therapies: the potential role of new MRI techniques to assess responders versus non-responders. Neurol Sci. 2005;Suppl 4:S209-12.
- 308 Traboulsee A. MRI: role in optimising treatment. J Neurol. 2004;251 Suppl 5:v36-v41.
- 309 Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, Ransohoff RM, Richert JR, Jacobs LD et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNbeta-1a) for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. J Neuroimmunol. 1999;93:8-14.
- 310 Verjans E, Theys P, Delmotte P, Carton H. Clinical parameters and intrathecal IgG synthesis as prognostic features in multiple sclerosis. Part I. J Neurol. 1983;229:155-65.
- 311 Joseph FG, Hirst CL, Pickersgill TP, Ben-Shlomo Y, Robertson NP, Scolding NJ. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2009;80:292-6.
- 312 Siritho S, Freedman MS. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2009;279:21-5.

- 313 Pichiecchio A, Tavazzi E, Maccabelli G, Ponzio M, Romani A, Schiappacassa R et al. MR peri-CSF lesions and CSF oligoclonal bands in Italian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*. 2008 Dec 22.
- 314 Huttner HB, Schellinger PD, Struffert T, Richter G, Engelhorn T, Bassemir T et al. MRI criteria in MS patients with negative and positive oligoclonal bands: equal fulfillment of Barkhof's criteria but different lesion patterns. *J Neurol*. 2009 Mar 1.
- 315 Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*. 1996;45:322-33.
- 316 Pashenkov M, Teleshova N, Kouwenhoven M, Kostulas V, Huang YM, Soderstrom M et al. Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:519-26.
- 317 Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Kivisäkk P, Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-10-secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta) treatment. *Clin Exp Immunol*. 2000;120:147-53.
- 318 Ozenci V, Kouwenhoven M, Link H. Cytokines in multiple sclerosis: methodological aspects and pathogenic implications. *Mult Scler*. 2002;8:396-404.
- 319 Elenkov IJ, Iezzoni DG, Daly A, Harris AG, Chrousos GP. Cytokine dysregulation, inflammation and well-being. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12:255-69.
- 320 Ozenci V, Pashenkov M, Kouwenhoven M, Rinaldi L, Söderström M, Link H. IL-12/IL-12R system in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2001;114:242-52.
- 321 Makhoulouf K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol*. 2001;119:145-9.
- 322 Heesen C, Sieverding F, Schoser BG, Hadji B, Kunze K. Interleukin-12 is detectable in sera of patients with multiple sclerosis - association with chronic progressive disease course? *Eur J Neurol*. 1999;6:591-6.

- 323 Mirandola SR, Hallal DE, Farias AS, Oliveira EC, Brandão CO et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol*. 2009;9:824-30.
- 324 Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology*. 1987;37:1097-102.
- 325 Link J, Söderström M, Ljungdahl A, Höjeberg B, Olsson T, Xu Z et al. Organ-specific autoantigens induce interferon-gamma and interleukin-4 mRNA expression in mononuclear cells in multiple sclerosis and myasthenia gravis. *Neurology*. 1994;44:728-34.
- 326 Link J, Söderström M, Olsson T, Höjeberg B, Ljungdahl A, Link H. Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1994;36:379-86.
- 327 Grimaldi LM, Martino G. Effect of interferon gamma on T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1995;1 Suppl 1:S38-43.
- 328 Hohnoki K, Inoue A, Koh CS. Elevated serum levels of IFN-gamma, IL-4 and TNF-alpha/unelevated serum levels of IL-10 in patients with demyelinating diseases during the acute stage. *J Neuroimmunol*. 1998;87:27-32.
- 329 Franciotta D, Zardini E, Bergamaschi R, Andreoni L, Cosi V. Interferon gamma and interleukin 4 producing T cells in peripheral blood of multiple sclerosis patients undergoing immunomodulatory treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74:123-6.
- 330 Sabry A, Sheashaa H, El-Husseini A, Mahmoud K, Eldahshan KF, George SK et al. Proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) in Egyptian patients with SLE: its correlation with disease activity. *Cytokine*. 2006;35:148-53.
- 331 Harigai M, Kawamoto M, Hara M, Kubota T, Kamatani N, Miyasaka N. Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B. *J Immunol*. 2008;181:2211-9.

- 332 Buntinx M, Moreels M, Vandenabeele F, Lambrichts I, Raus J, Steels P et al. Cytokine-induced cell death in human oligodendroglial cell lines: I. Synergistic effects of IFN-gamma and TNF-alpha on apoptosis. *J Neurosci Res*. 2004;76:834-45.
- 333 Rieckmann P, Albrecht M, Kitze B, Weber T, Tumani H, Broocks A et al. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1994;44:1523-6.
- 334 Chofflon M, Juillard C, Juillard P, Gauthier G, Grau GE. Tumor necrosis factor alpha production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw*. 1992;3:523-31.
- 335 Baraczka K, Pozsonyi T, Szüts I, Ormos G, Nékám K. Increased levels of tumor necrosis alpha and soluble vascular endothelial adhesion molecule-1 in the cerebrospinal fluid of patients with connective tissue diseases and multiple sclerosis. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2003;50:339-48.
- 336 Shi N, Kawano Y, Matsuoka T, Mei F, Ishizu T, Ohyagi Y, Kira J. Increase of CD4+TNF{alpha}+IL-2-T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2009;15:120-3.
- 337 Hartung HP, Archelos JJ, Zielasek J, Gold R, Koltzenburg M, Reiners KH et al. Circulating adhesion molecules and inflammatory mediators in demyelination: a review. *Neurology*. 1995;45(6 Suppl 6):S22-32.
- 338 Gómez D, Correa PA, Gómez LM, Cadena J, Molina JF et al. Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? *Semin Arthritis Rheum*. 2004;33:404-13.
- 339 Aringer M, Smolen JS. The role of tumor necrosis factor-alpha in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2008;10:202.
- 340 Lourenço EV, La Cava A. Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med*. 2009;9:242-54.

341 Svenungsson E, Andersson M, Brundin L, van Vollenhoven R, Khademi M, Tarkowski A et al. Increased levels of proinflammatory cytokines and nitric oxide metabolites in neuropsychiatric lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*. 2001;60:372-9.

342 Santer DM, Yoshio T, Minota S, Möller T, Elkon KB. Potent induction of IFN-alpha and chemokines by autoantibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neuropsychiatric lupus. *J Immunol*. 2009;182:1192-201.

343 Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996;17:138-46.

344 Petereit HF, Pukrop R, Fazekas F, Bamborschke SU, Röpele S, Kölmel HW et al.

Low interleukin-10 production is associated with higher disability and MRI lesion load in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2003;206:209-14.

345 Perrella O, Sbreglia C, Perrella M, Spetrini G, Gorga F, Pezzella M et al. Interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha: model of immunomodulation in multiple sclerosis. *Neurol Res*. 2006;28:193-5.

346 Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol*. 1998;161:4437-46.

347 Filion LG, Matusevicius D, Graziani-Bowering GM, Kumar A, Freedman MS. Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis. *Clin Immunol*. 2003;106:127-38.

348 Huang WX, Huang P, Link H, Hillert J. Cytokine analysis in multiple sclerosis by competitive RT - PCR: A decreased expression of IL-10 and an increased expression of TNF-alpha in chronic progression. *Mult Scler*. 1999;5:342-8.

349 Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Xiao B, Kivisäkk P, Fredrikson S, Link H. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment. *Scand J Immunol*. 1999;49:554-61.

- 350 Nakashima I, Fujihara K, Misu T, Okita N, Takase S, Itoyama Y. Significant correlation between IL-10 levels and IgG indices in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2000;111:64-7.
- 351 Baraczka K, Nékám K, Pozsonyi T, Szüts I, Ormos G. Investigation of cytokine (tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10) concentrations in the cerebrospinal fluid of female patients with multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Eur J Neurol*. 2004;11:37-42.
- 352 Emilie D. Interleukin 10 in disseminated lupus erythematosus. *J Soc Biol*. 2002;196:19-21.
- 353 Fragoso-Loyo H, Cabiedes J, Orozco-Narváez A, Dávila-Maldonado L, Atisha-Fregoso Y. *PLoS One*. 2008;3:e3347.
- 354 Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:852-8.
- 355 Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2004;14:164-74.
- 356 Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:205-17.
- 357 Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130:1089-104.
- 358 Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 2007; 204: 2899–2912.
- 359 Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999;5:170-5.

- 360 Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M. Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;108:207-15.
- 361 Baumhufner RW, Tourtellotte WW, Syndulko K, Waluch V, Ellison GW, Meyers LW et al. Quantitative multiple sclerosis plaque assessment with magnetic resonance imaging. Its correlation with clinical parameters, evoked potentials, and intra-blood-brain barrier IgG synthesis. *Arch Neurol.* 1990;47:19-26.
- 362 Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Navarro G, Gata JM et al. Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand.* 2002;105:158-63.
- 363 Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2003;53:222-6.
- 364 Perini P, Ranzato F, Calabrese M, Battistin L, Gallo P. Intrathecal IgM production at clinical onset correlates with a more severe disease course in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:953-5.
- 365 Barkhof F, Filippi M. MRI--the perfect surrogate marker for multiple sclerosis? *Nat Rev Neurol.* 2009;5:182-3.
- 366 Mammi S, Filippi M, Martinelli V, Campi A, Colombo B, Scotti G et al. Correlation between brain MRI lesion volume and disability in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 1996;94:93-6.
- 367 Paolillo A, Pozzilli C, Gasperini C, Giugni E, Mainero C, Giuliani S et al. Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis: relationship with 'black holes', disease duration and clinical disability. *J Neurol Sci.* 2000;174:85-91.
- 368 Bonneville F, Moriarty DM, Li BS, Babb JS, Grossman RI, Gonen O. Whole-brain N-acetylaspartate concentration: correlation with T2-weighted lesion volume and expanded disability status scale score in cases of relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2002;23:371-5.

- 369 Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002;346:158-64.
- 370 Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008;131:808-17.
- 371 Mesaroc S, Drulović J, Lević Z, Perić V. Magnetic resonance findings in the brain of patients with multiple sclerosis without oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid. *Srp Arh Celok Lek*. 2003;131:31-5.
- 372 Brex PA, O'Riordan JI, Miszkiel KA, Moseley IF, Thompson AJ, Plant GT et al. Multisequence MRI in clinically isolated syndromes and the early development of MS. *Neurology*. 1999;53:1184-90.
- 373 O'Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP, MacManus DG, Kendall BE, Rudge P et al. The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain*. 1998;121:495-503.
- 374 Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Kolson DL, McGowan JC. Magnetization transfer ratio histogram analysis of gray matter in relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2001;22:470-5.
- 375 Filippi M, Rocca MA. Disturbed function and plasticity in multiple sclerosis as gleaned from functional magnetic resonance imaging. *Curr Opin Neurol*. 2003;16:275-82.
- 376 Mainero C, De Stefano N, Iannucci G, Sormani MP, Guidi L, Federico A et al. Correlates of MS disability assessed in vivo using aggregates of MR quantities. *Neurology*. 2001;56:1331-4.
- 377 Bermel RA, Bakshi R. The measurement and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2006;5:158-70.
- 378 Neema M, Stankiewicz J, Arora A, Dandamudi VS, Batt CE, Guss ZD et al. T1- and T2-based MRI measures of diffuse gray matter and white matter damage in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimaging*. 2007;17 Suppl 1:16S-21S.

- 379 Riva M, Ikonomidou VN, Ostuni JJ, van Gelderen P, Auh S, Ohayon JM et al. Tissue-Specific Imaging Is a Robust Methodology to Differentiate In Vivo T1 Black Holes with Advanced Multiple Sclerosis-Induced Damage. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2009 Apr 30.
- 380 Roccatagliata L, Vuolo L, Bonzano L, Pichiecchio A, Mancardi GL. Multiple sclerosis: hyperintense dentate nucleus on unenhanced T1-weighted MR images is associated with the secondary progressive subtype. *Radiology*. 2009;251:503-10.
- 381 De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol*. 2001;58:65-70.
- 382 Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJ. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;72:1322-9.
- 383 Grassiot B, Desgranges B, Eustache F, Defer G. Quantification and clinical relevance of brain atrophy in multiple sclerosis: a review. *J Neurol*. 2009 Apr 8.
- 384 Minneboo A, Uitdehaag B, Jongen P, Vrenken H, Knol D, van Walderveen M et al. Association between MRI parameters and the MS severity scale: a 12 year follow-up study. *Mult Scler*. 2009;15:632-7.
- 385 Sanfilipo MP, Benedict RH, Sharma J, Weinstock-Guttman B, Bakshi R. The relationship between whole brain volume and disability in multiple sclerosis: a comparison of normalized gray vs. white matter with misclassification correction. *Neuroimage*. 2005;26:1068-77.
- 386 Fisher E, Lee JC, Nakamura K, Rudick RA. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol*. 2008;64:255-65.
- 387 Mesaros S, Rovaris M, Pagani E, Pulizzi A, Caputo D, Ghezzi A et al. A magnetic resonance imaging voxel-based morphometry study of regional gray matter atrophy in patients with benign multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65(9):1223-30.

- 388 Rudick RA, Lee JC, Nakamura K, Fisher E. Gray matter atrophy correlates with MS disability progression measured with MSFC but not EDSS. *J Neurol Sci.* 2009;282:106-11.
- 389 Daumer M, Neuhaus A, Morrissey S, Hintzen R, Ebers GC. MRI as an outcome in multiple sclerosis clinical trials. *Neurology.* 2009;72:705-11.
- 390 Zivadinov R, Minagar A. Evidence for gray matter pathology in multiple sclerosis: a neuroimaging approach. *J Neurol Sci.* 2009;282:1-4.
- 391 Chard DT, Brex PA, Ciccarelli O, Griffin CM, Parker GJ, Dalton C et al. The longitudinal relation between brain lesion load and atrophy in multiple sclerosis: a 14 year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:1551-4.
- 392 De Stefano N, Iannucci G, Sormani MP, Guidi L, Bartolozzi ML, Comi G et al. MR correlates of cerebral atrophy in patients with multiple sclerosis. *J Neurol.* 2002;249:1072-7.
- 393 Pascual AM, Martínez-Bisbal MC, Bosca I, Valero C, Coret F, Martínez-Granados B et al. Axonal loss is progressive and partly dissociated from lesion load in early multiple sclerosis. *Neurology.* 2007;69:63-7.
- 394 Charil A, Dagher A, Lerch JP, Zijdenbos AP, Worsley KJ, Evans AC. Focal cortical atrophy in multiple sclerosis: relation to lesion load and disability. *Neuroimage.* 2007;34:509-17.
- 395 Bakshi R, Neema M, Healy BC, Liptak Z, Betensky RA, Buckle GJ et al. Predicting clinical progression in multiple sclerosis with the magnetic resonance disease severity scale. *Arch Neurol.* 2008;65:1449-53.
- 396 Schneider A, Araújo GW, Trajkovic K, Herrmann MM, Merkler D, Mandelkow EM et al. Hyperphosphorylation and aggregation of tau in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Biol Chem.* 2004;279:55833-9.
- 397 Anderson JM, Hampton DW, Patani R, Pryce G, Crowther RA, Reynolds R et al. Abnormally phosphorylated tau is associated with neuronal and axonal loss in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Brain.* 2008;131:1736-48.

- 398 Anderson JM, Patani R, Reynolds R, Nicholas R, Compston A, Spillantini MG et al. Evidence for abnormal tau phosphorylation in early aggressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2009;117:583-9.
- 399 Thomann PA, Kaiser E, Schönknecht P, Pantel J, Essig M, Schröder J. Association of total tau and phosphorylated tau 181 protein levels in cerebrospinal fluid with cerebral atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *J Psychiatry Neurosci.* 2009;34:136-42.
- 400 Jiménez-Jiménez FJ, Zurdo JM, Hernanz A, Medina-Acebrón S, de Bustos F, Barcenilla B. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2002;106:351-4.
- 401 Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 1998;338:278-85.
- 402 Narayana PA. Magnetic resonance spectroscopy in the monitoring of multiple sclerosis. *J Neuroimaging.* 2005;15(4 Suppl):46S-57S.
- 403 De Stefano N, Matthews PM, Filippi M, Agosta F, De Luca M, Bartolozzi ML et al. Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology.* 2003;60:1157-62.
- 404 Kantarci OH, Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 2005;23:17-38.
- 405 Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1994;36 Suppl:S6-11.
- 406 Ramsaransing GS, De Keyser J. Benign course in multiple sclerosis: a review. *Acta Neurol Scand.* 2006;113:359-69.
- 407 Trojano M, Liguori M, Bosco Zimatore G, Bugarini R, Avolio C, Paolicelli D et al. Age-related disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2002;51:475-80.

408 Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129:595-605.

409 Vukusic S, Confavreux C. Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol*. 2007;20:269-74.

8- ANEXOS



Separata
Arquivos de Neuro-Psiquiatria
Volume 63 (2005)

CYTOKINES AND INTRATHECAL IgG SYNTHESIS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS DURING CLINICAL REMISSION

*CARLOS OTÁVIO BRANDÃO, HELOÍSA HELENA RUOCCO,
ALESSANDRO DOS SANTOS FARIAS, CELINA OLIVEIRA,
DANNIE EIKO MAEDA HALLAL-LONGO, SANDRA REGINA MIRANDOLA,
ELAINE CONCEIÇÃO OLIVEIRA, FERNANDO CENDES,
BENITO PEREIRA DAMASCENO, LEONILDA MARIA BARBOSA SANTOS*

CYTOKINES AND INTRATHECAL IgG SYNTHESIS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS DURING CLINICAL REMISSION

Carlos Otávio Brandão¹, Heloísa Helena Ruocco²,
Alessandro dos Santos Farias¹, Celina Oliveira¹,
Dannie Eiko Maeda Hallal-Longo¹, Sandra Regina Mirandola¹,
Elaine Conceição Oliveira¹, Fernando Cendes²,
Benito Pereira Damasceno², Leonilda Maria Barbosa Santos¹

ABSTRACT - Cytokines and intrathecal IgG synthesis were determined in the cerebrospinal fluid (CSF) and sera to evaluate inflammatory activity in multiple sclerosis (MS) patients during clinical remission. Although the disease was stable, there had been a significant increase of proinflammatory cytokines such as TNF α and IFN γ in the CSF and serum, with no significant changes of IL12 and IL10 production. The changes in the cytokine production patterns were associated with an increase of leukocytes in the CSF, as well as the presence of oligoclonal bands suggesting intrathecal IgG synthesis. These results suggest that even when the disease is clinically silent, one can observe inflammatory activity in these MS patients.

KEY WORDS: multiple sclerosis; cerebrospinal fluid; cytokines; intrathecal IgG synthesis.

Citocinas e síntese intratecal de IgG em pacientes com esclerose múltipla durante remissão clínica

RESUMO - Os níveis de citocinas e síntese intratecal de IgG foram dosados no líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro, com o objetivo de avaliar a atividade inflamatória em pacientes com esclerose múltipla durante remissão clínica. Foram detectados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IFN γ) no LCR e soro, sem alterações significativas na produção de IL12 e IL10. O perfil de produção das citocinas pró-inflamatórias estava associado ao aumento de leucócitos no LCR, assim como a presença de bandas oligoclonais IgG sugerindo síntese intratecal de IgG. Estes resultados sugerem que mesmo quando a doença está clinicamente silenciosa, a atividade inflamatória está presente nestes pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: esclerose múltipla, líquido cefalorraquidiano, citocinas, IgG síntese intratecal.

Multiple sclerosis (MS) is a disorder of the central nervous system (CNS) characterized by perivascular inflammation and demyelination in the white matter. The etiology and pathogenesis of MS is unknown, although it is a complex phenomenon involving both genetic and environmental aspects. These forces interact to produce individual susceptibility to the disease and influence its course¹. Although MS is a disease of the CNS, the peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) of patients contain activated autoreactive T cells recognizing myelin components such as myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), myelin associated glycoprotein and myelin oligodendrocyte glycoprotein

(MOG)². Activated T lymphocytes also produce cytokines that modulate the immune response either positively or negatively. Some of these cytokines have proinflammatory effects enhancing inflammatory reactions; whereas others have anti-inflammatory properties. The cytokines produced by Th1 cells, such as tumor necrosis factor alpha (TNF α) and interferon gamma (IFN γ), may promote the progress of the disease^{3,4}, while those produced by the Th2/Th3 subsets, such as interleukin 10 (IL10) and transforming growth factor beta (TGF β), may limit it⁵. Some authors have also reported the important contribution of antibodies in the initiation of myelin sheath damage in MS⁶.

¹Department of Microbiology and Immunology; ²Department of Neurology, Medical School, University of Campinas, Campinas SP, Brazil (UNICAMP). Financial support: FAPESP (grant # 00/07703-7, 01/12827-0); CNPq (grant # 300375/84-87) and FAEP-UNICAMP.

Received 6 December 2004, received in final form 13 June 2005. Accepted 4 August 2005.

Dra. Leonilda M.B. Santos - Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia / UNICAMP - 13083-970 Campinas SP - Brazil. E-mail: leonilda@unicamp.br

For diagnosis, magnetic resonance imaging (MRI) has shown great potential as an indicator of disease activity in patients with MS⁷, with the use of CSF analysis receiving less attention. However, the CSF analysis is still a valuable tool and in association with imaging data provide reliable information about the inflammatory status of a patient.

In the present study, we assessed serum and CSF levels of cytokines, leukocytes count and intrathecal IgG synthesis to evaluate inflammatory activity in a subgroup of untreated MS Brazilian patients during clinical remission.

METHOD

Patients – Patients were recruited at the hospital of the University of Campinas, located in Campinas, SP, Brazil, during the period of 2002-2004. A total of 58 individuals (42 women and 16 men) were included in the study. At that time, the individuals were divided into three groups: I. 23 clinically definite MS patients (6 men, 17 women, the mean age was 30) with a relapsing-remitting form of disease (RRMS) according to Poser criteria⁸; II. 16 patients with other neurologic diseases (3 men, 13 women, the mean age was 33): 4 with motor neuron disease, 2 with hereditary sensory-motor neuropathy, 2 with Parkinson's disease, 4 with epilepsy, 2 Alzheimer's disease, 2 with cerebrovascular disease; III. 19 individuals (7 men, 12 women, the mean age was 31 years) with backache or headache and who had no evidence of organic neurological disease, studied as a healthy control group. The patients with clinically definite MS who were seen in our MS clinic were studied. MRI and laboratory investigations were performed during the initial contact for diagnosis purposes and the determination that the patients were in remission, without treatment. The delay between first attack and first consultation was 4.2 ± 3.8 years. The Expanded Disability Status Scale (EDSS) score was determined at lumbar puncture. None of the patients had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating CSF and blood for the study. The study was approved by the Medical Ethics Committee of the hospital, and informed consent was obtained.

Samples – All specimens were obtained for the routine determination of CSF leukocyte count, IgG synthesis and oligoclonal IgG bands. Paired samples of serum and CSF were stored at -80°C until these exams were performed. The CSF (10 mL) was taken and cell counting done quickly before sampling.

Laboratory procedures – IgG and albumin in the CSF and serum were measured by nephelometry (BNII; Dade Behring, Marburg, Germany), and Link Indexes (LI) were calculated according to the literature⁹. Oligoclonal IgG bands were identified by isoelectrofocusing¹⁰.

Antigen, antibody and recombinant cytokines – The IL12, IFN γ , TNF α , and IL10 were quantified using commercial kits from Biosource International, Nivelles, Belgium. All measure was made at the single occasion in order to minimize the intra assay variability. Briefly, 96-well microtiter plates were coated with 1-2 $\mu\text{g/mL}$ of capture monoclonal antibody for each cytokine in 0.1M NaHCO₃ (pH= 8.5) and allowed to incubate overnight at 4°C . Following blocking with 3% dry milk in PBS at room temperature for 2 h, samples and standard recombinant IFN γ , TNF α , IL10 and IL12 were added again and incubated overnight at 4°C . Then, 0.5-2.0 $\mu\text{g/mL}$ of biotinylated detection monoclonal antibody for human IL12, IFN γ , TNF α and IL10 were added, followed by the addition of avidin-peroxidase 1/400 (Sigma Chem.- USA) and the peroxidase substrate. A stop solution was used to obtain OD determined at 492 nm.

Imaging – MRIs were performed, using a 2.0 Tesla system (Elsint, Prestige[®]). All exams covered the whole brain using 6.0 mm slice thick and 1.2 mm inter-slice gap. MRI acquisition parameters for images used for analysis were: T1 sagittal images and T2 axial.

Statistics – The statistical significance of the results was determined using a non-parametric analysis of variance, and a Kruskal-Wallis test and Spearman Rank test. A *p* value smaller than 0.05 was considered to be significant.

RESULTS

Twenty three patients with MS were evaluated (Table 1). Brain MRI showed abnormalities with demyelinating lesions in 23 (100 %) and presence of gadolinium-enhancing lesions in 5 (21 %) of the 23 MS patients. These patients showed CSF hypercytosis and intrathecal IgG synthesis. Twenty-one (91.3 %) MS patients were oligoclonal bands (OCB) positive.

CSF data and patients characteristics of the groups are shown in Table 2. The percentage of patients with hypercytosis was increased in the MS group when compared with the group II (other neurologic diseases; *p*= 0.004) and group III (healthy controls; *p*= 0.0001).

Production of TNF α in CSF and serum of patients with MS, other neurological disorders, as well as healthy controls – The means for MS patients were 137.3 ± 119.7 and 116.0 ± 115 pg/ml in serum and CSF, respectively; whereas for the OND group these were 7.6 ± 24.1 and 8.6 ± 28.4 pg/ml for serum and CSF, respectively; for the healthy controls, these values were 15.3 ± 19.8 and 4.3 ± 8.2 pg/ml. A significant increase (*p*<0.001) in TNF α was observed in the CSF, and serum of patients with MS.

Table 1. Clinical and laboratory data of relapsing-remitting multiple sclerosis group.

Patient	Age, y	Sex	DD	N.rel.	EDSS1	Cells	Alb- I	IgG- I	OB IgG
1	44	M	1	2	1	8	2.6	0.65	+
2	32	M	3	4	2.5	15	5.23	0.51	-
3	32	F	3	3	1.5	20	3.64	3.35	+
4	37	M	3	5	2	2	2.82	1	+
5	30	F	4	4	3	3	2.25	0.82	+
6	22	F	4	5	2	16	2.4	0.98	+
7	10	F	8	2	2	14	5.84	0.84	+
8	25	F	7	4	1.5	13	2.7	1.49	+
9	43	M	9	6	2	1	7.97	1.12	+
10	24	F	2	4	2	15	3.25	0.76	+
11	46	F	9	3	3	13	6.4	1.73	+
12	43	F	12	6	2.5	3	4	0.88	+
13	33	F	5	4	1.5	1	5.13	0.67	+
14	35	F	13	5	2	3	1.97	1.52	+
15	29	F	11	3	1	16	5.9	0.81	+
16	43	M	8	2	2	1	1.66	0.59	-
17	25	F	5	4	2	5	3.44	0.83	+
18	13	M	3	9	2	24	4	0.74	+
19	21	M	7	3	1	5	6.17	0.6	+
20	37	F	1	2	1.5	18	5.1	2.37	+
21	21	F	7	6	1.5	5	5.35	1.66	+
22	39	F	6	2	1	4	5.37	1.03	+
23	40	F	4	3	2.5	5	4	0.8	+

DD, duration of disease; EDSS1, Expanded Disability Status Scale at the time of the study; Alb-I, albumin index; IgG-I, IgG index; OB IgG, oligoclonal IgG bands; N.rel., number of relapses; y, years.

Table 2. Patients characteristics, number of CSF leukocytes, intrathecal IgG synthesis index and oligoclonal bands.

Patients	Age, y (mean $\pm$ SD)	Te, y	Sex, M/F	Cells	IgG-index	OB IgG+
MS (23)	30 $\pm$ 9	5 $\pm$ 3	6/ 17	9.13 $\pm$ 7.05	1.12 $\pm$ 0.66	21/ 23
ODN (16)	31 $\pm$ 10	6 $\pm$ 3	3/ 13	4.19 $\pm$ 5.55	0.53 $\pm$ 0.13	1/ 16
HC (19)	37 $\pm$ 16	-	6/ 13	1.47 $\pm$ 0.77	0.45 $\pm$ 0.12	0/ 19

MS, multiple sclerosis; ODN, other neurologic diseases; HC, healthy controls; OB, oligoclonal bands; Te, time of evolution; y, years; SD, standard deviation.

TNF α levels in the CSF exceeded those in the serum for 10/23 patients, suggesting an intrathecal synthesis (Fig 1A). There was a positive correlation between the number of leukocytes in the CSF and the level of TNF α ($R^2 = 0.6874$, $p = 0.001$).

Production of IL12p40 in CSF and serum – The means for MS patients were 49.1 ± 18.3 and 39.4 ± 13.2 pg/mL for serum and CSF, respectively; whereas for the ODN group they were 76.2 ± 32.2 and 58.1 ± 35.1 pg/mL; for the healthy controls these means were 57.4 ± 18.8 and 45.4 ± 15.3 pg/mL. No significant difference ($p > 0.05$) were observed between the three groups (Fig 1 B).

Production of IFN γ in CSF and serum patients with MS and, other neurological disorders, as well as healthy controls – The means for MS patients were 500.9 ± 169.5 and 359.0 ± 85.1 pg/mL in serum and CSF respectively; whereas for the ODN group, these were 418.6 ± 67.0 and 325.2 ± 70.5 pg/mL; for the healthy controls these mean were 102.6 ± 102.7 and 54.1 ± 39.6 pg/mL. A significant increase ($p < 0.001$) in the IFN γ was observed in both CSF and serum of patients with both MS and ODN (Fig 1C).

Production of IL-10 in CSF and serum – The means for MS patients were 304.6 ± 112.0 and $287.6 \pm$

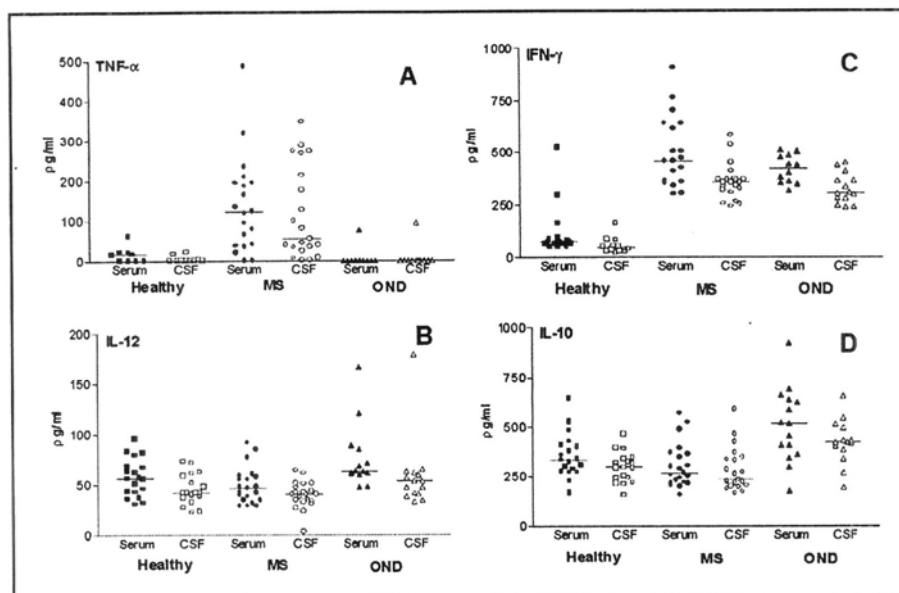


Fig 1. Production of cytokines (TNF α , IL 12, IFN γ and IL 10) in the CSF and sera from MS patients, OND (other neurologic diseases) and healthy controls, detected by ELISA.

113.7 pg/mL for serum and CSF, respectively; whereas for the OND group they were 507.6 ± 187.1 and 424.3 ± 113.7 pg/mL for serum and CSF, respectively; for the healthy controls, these means were 354.6 ± 111.4 and 296.2 ± 74.8 pg/mL. No significant differences were found between the patients with MS and healthy controls ($p > 0.05$), whereas the OND group of patients revealed significantly higher levels of IL 10 ($p = 0.006$) (Fig 1D).

DISCUSSION

The purpose of this investigation was to evaluate inflammatory activity in MS patients during clinical remission. Our results showed that patients with MS which is identified stable phase of the disease reveal increase in the secretion of pro-inflammatory cytokines in both serum and CSF associated with the increase in the intrathecal synthesis of IgG and the number of leukocytes in the CSF. This study demonstrated that patients with stable RRMS have an elevated number of leukocytes in the CSF when compared with patients with other non-inflammatory diseases of CNS and healthy controls. Other studies suggested that the presence of white blood cells in the CSF is a good predictor of the activity of MS, since after two years, patients with a high number of white blood cells in the CSF had more relapses than those in control group¹¹.

Parallel to the increase of the number of cells there is also the presence of oligoclonal bands in 91% of studied MS patients. These results are in agreement with previous Brazilian reports^{12,13}. Although the antibody specificity in the oligoclonal bands is still enigmatic, as suggested by reports in the literature, a lack of intrathecal synthesis of oligoclonal IgG bands is related to short lasting and benign course of MS¹⁴.

The B-cell proliferation, differentiation and antibody production is coordinated by the helper T cells and the cytokines they produce. Although Th1 and Th2 cells are the major sources of their respective cytokines, many others cells within and outside the immune system also produce these cytokines, contributing to an overall Th1 and Th2 cytokine pattern. It was thus decided to quantify both pro and anti-inflammatory cytokines in the CSF and the serum, independent of their source.

The cytokines produced in the early phase of inflammatory response, such as IL12, contribute to the development of Th1 immune response. Conflicting results regarding IL12 production have, however, been observed in MS. An increase in the production of this cytokine has been observed in progressive MS¹⁵ and increased frequencies of IL-12 secreting monocytes appear to correlate with

the presence of active brain lesions detected by MRI¹⁶. Serum levels of IL12, however, have been found to be similar in MS patients and controls¹⁷. In the present study, as well, no change in the production of this cytokine was observed in the serum or CSF of MS patients. It seems that, blood monocytes must be stimulated in order to produce detectable amounts of IL12, but since we did not use activated cells, the production of IL12 may have been too low to be detected in the ELISA assay.

The IFN γ of MS patients, on the other hand, showed significant increase in the CSF and serum over that of healthy controls, although no difference was observed in relation to the OND group. Initially, interferons were tested as therapeutic agents for MS because of their antiviral properties and it was felt that MS might be due to persistent viral infection. However, a pathogenic role for MS patients who received recombinant IFN γ treatment in MS has been reported¹⁸. Our data support previous ones which demonstrated that IFN γ has potent proinflammatory response, including the ability to induce the production of other proinflammatory cytokines¹⁹. In the animal model, the production of isotypes of IgG, such as IgG2a is induced by the IFN γ . In our findings, no information is given about the subclass of IgG, which is increased in the CSF of MS patients, but it is possible that the increase in intrathecal IgG production is due to the increase in intrathecal synthesis of IFN γ .

In addition to the production of IFN γ , there was a parallel increase of TNF α in the serum and CSF. Approximately 40 % of the MS patients presented levels of TNF α in the CSF equal to or greater than that in the serum, suggesting the intrathecal synthesis of this cytokine. TNF α has been described as a major cytokine in this demyelinating disease, since it has been demonstrated to be myelinotoxic²⁰⁻²³. TNF α is also a major inducer of endothelial adhesion molecules and chemokines, hence, the upregulation TNF α may have a major effect on the recruitment of leukocytes to the CNS²⁴. In this study it was possible to show a positive correlation between the number of leukocytes in the CSF and the level of TNF α . This property may explain, at least in part, the increased number of inflammation-perpetuating leukocytes observed in the CSF in MS patients. Elevation in CSF concentrations of soluble ICAM-1 and soluble TNF α receptor were demonstrated previously in Brazilian MS patients with acute relapsing form of MS during exacerbation²⁵.

As the inflammatory response develops, the cytokine products of Th1 or Th2 lymphocytes provide mutually inhibitory functions for the differentiation and effector effect of the reciprocal phenotype. IFN γ prevent Th2 cell proliferation, whereas IL10 profoundly inhibits the synthesis of Th1 cytokines²⁶. Reports on the IL-10 production showed that patients with high IL-10 production had significantly lower disability scores and lower T2 lesion load²⁷. In the present study, we did not observe significant changes in IL10 levels in MS patients. These data agree with that of studies demonstrating a reduction in IL10 levels in the serum, as well as in the number of IL10-secreting cells in MS patients^{19,28-30}, reinforcing the fact that the proinflammatory response prevails in this group of patients, despite the absence of clinical manifestation.

This study provides evidence of a significant increase in inflammatory activity in patients with stable MS over that in the control groups. These observations suggest that an investigation of the inflammatory parameters in the CSF may provide a valuable tool, which would be useful in the indication of activity of the disease, thus helping understand the damages caused by the inflammatory response.

Acknowledgements - The authors acknowledge the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript and of Gislaire C.L. Brito for the technical assistance.

REFERENCES

- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996;85:299-302.
- Ota K, Matsui M, Milford EL, et al. T cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1999; 346:183-187.
- Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:467-472.
- Costa PM, Yasuda CL, Scagliusi SM, et al. Pattern of cytokines secretion by peripheral blood cells of patients with multiple sclerosis in Brazil. *Mult Scler* 2000;6:293-299.
- Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, et al. Blood levels of transforming growth factor beta 1 are elevated in both relapsing-remitting and chronic progressive multiple sclerosis patients and are further augmented by treatment with interferon beta. *Clin Exp Immunol* 1998;113:96-99.
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nature Med* 1999;5:170-175.
- Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF. The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:3-24.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983; 13:227-231.
- Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders: III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37:397-401.

Original Paper

NeuroImmunoModulation

Neuroimmunomodulation 2006;13:89–95
DOI: 10.1159/000096091Received: April 24, 2006
Accepted: August 16, 2006
Published online: October 10, 2006

Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis and Brain Injury by Quantitative MRI in Multiple Sclerosis

Carlos O. Brandão^a Heloisa H. Ruocco^b Alessandro S. Farias^a Celina Oliveira^a
Fernando Cendes^b Benito P. Damasceno^b Leonilda M.B. Santos^aDepartments of ^aMicrobiology and Immunology, and ^bNeurology, Neuroimmunology Unit, Medical School, University of Campinas, Campinas, Brazil**Key Words**

Brain parenchymal fraction · Cerebrospinal fluid · Imaging brain total lesion volume · Intrathecal immunoglobulin G synthesis · Magnetic resonance · Multiple sclerosis

Abstract

Objectives: It was the aim of this study to evaluate if the quantitative intrathecal immunoglobulin G (IgG) synthesis correlates with the brain atrophy and the total lesion volume (TLV) in brain magnetic resonance imaging (MRI) of multiple sclerosis (MS) patients. **Methods:** A total of 50 patients with relapsing-remitting MS were included in this study. MRIs were performed and cerebrospinal fluid samples were collected during the diagnostic determination when patients were in remission without treatment. **Results:** At study baseline, IgG index values were elevated in 36 patients (72%), and oligoclonal IgG bands were positive in 42 of 50 patients (84%). Brain MRI was abnormal in 94% of patients, and, compared with healthy controls, brain atrophy was observed in MS patients. A positive correlation among IgG index, cerebrospinal fluid leukocyte count and TLV was observed; the Expanded Disability Status Scale correlated positively with TLV and the number of lesions, although a significant relationship between disability and brain atrophy was not dem-

onstrated. **Conclusions:** Although new parameters will be necessary in longitudinal studies to characterize the axonal injury in various stages of the disease, the data suggest that the high intrathecal IgG synthesis may predict a greater brain lesion burden.

Copyright © 2006 S. Karger AG, Basel

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS). The etiology and pathogenesis of MS is unknown, and the molecular mechanisms implicated in myelin damage still remain uncertain. Genetic susceptibility and environmental factors have been related to a risk of MS [1]. Many authors suggested that MS is mediated by an autoimmune response against CNS myelin antigens with an important contribution of antibodies to the initiation of myelin sheath damage [2].

The pathological hallmark of MS is the demyelinated plaque with relative axonal sparing and glial scar formation [3]. Magnetic resonance imaging (MRI) is the most widely used technique for detecting demyelination in the CNS [4]. Lesion load measurements have proven an ex-

KARGERFax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com© 2006 S. Karger AG, Basel
1021-7401/06/0132-0089\$23.50/0Accessible online at:
www.karger.com/nimLeonilda M.B. Santos, PhD
Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biologia, UNICAMP
Campinas SP Brazil CEP 13083-970
Tel. +55 19 3788 6262, Fax +55 19 3788 6276
E-Mail carlosotavio@neurolifelaboratorios.com.br

cellent alternative for assessing the efficacy of therapy for MS [5–7]. However, the potential role of quantitative MRI for providing information about the course of the disease is not well understood. Although MS is the prototype of demyelinating disease, the presence of axonal damage may occur early in the disease and has been considered an important factor in the progression of the disease [8, 9]. The cumulative effect of axonal damage may result in brain atrophy [10]. It is difficult to make a prognosis for a given patient, yet it is very important to be able to predict the course of the disease as early as possible in order to initiate treatment. Some studies found a significant association between intrathecal antibody synthesis and the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and have hypothesized the contribution of antibodies in lesion development [11–13].

In this study, we performed MRI to measure brain atrophy and quantify brain lesion burden. We assessed cerebrospinal fluid (CSF) inflammatory parameters during clinical remission in a series of patients with relapsing-remitting MS (RRMS) in an attempt to elucidate whether high immunoglobulin G (IgG) index values and a CSF leukocyte count could be associated with high brain lesion burden and brain atrophy.

Patients and Methods

Patients

Patients with clinically definite MS who were seen in our MS clinic between 1997 and 2003 were studied. The study was approved by the Ethics Committee of our Institution, and informed consent was obtained from all patients. Patients were chosen during diagnostic determination in sequential visits. A total of 50 patients (36 women and 14 men), with ages ranging from 10 to 46 years (mean age 30 years), all with the RR form of the disease, according to Poser's criteria [14], were included in the study. MRI and laboratory investigations were performed when patients experienced remission of symptoms and before any chronic immunomodulating or immunosuppressive treatment. The EDSS score was assessed at lumbar puncture [15]. The delay between the first attack and the first consultation (lumbar puncture) was 4.0 years.

Twenty healthy volunteers (9 men and 11 women), with ages ranging from 20 to 62 years (mean age 32 years), were studied as a control group. They were recruited from the local community and had no family history of neurological or psychiatric illness.

Patients with significant comorbidities, such as alcoholism, head injury, arterial hypertension, diabetes mellitus, stroke, drug abuse and malignancy were excluded. Neurological exams were performed in all patients by the same investigator.

Serum and CSF Samples

All specimens were obtained after the first consultation for routine determination of CSF leukocyte count and IgG synthesis.

None of the patients had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating CSF and blood for the study.

Laboratory Procedures

IgG and albumin in the CSF and serum were measured by nephelometry (BNII; Dade Behring, Marburg, Germany), and IgG indexes were calculated according to the literature [16]. Oligoclonal IgG bands were identified by isoelectrofocusing [17].

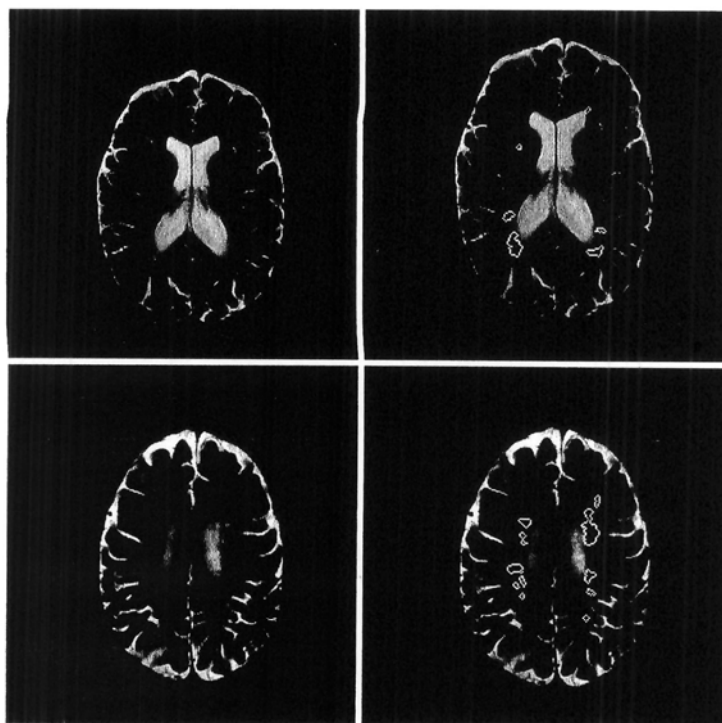
Imaging

MRI examinations were performed using a 2.0-tesla system (Elscent, Prestige®). Sections were made in the coronal, sagittal and axial planes. All exams covered the whole brain using a 6.0-mm-thick slice and a 1.2-mm inter-slice gap. MRI acquisition parameters for images used for analysis include: (1) T₁ sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, repetition time (TR) 550 ms, echo time (TE) 12 ms, matrix 270 × 200; (2) T₁ axial images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 300 × 210; (3) T₂ sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 6,600 ms, TE 128 ms, matrix 320 × 252; (4) axial double echo images, proton density weighted, 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 16 ms, matrix 256 × 256; T₂, 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 128 ms, matrix 256 × 256; inversion time 2,550 ms; (5) axial flair images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 10,099 ms, TE 90 ms, matrix 250 × 250; (6) coronal T₁, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 270 × 200. Administration of 0.1 mmol/kg of gadolinium-DTPA was used.

Brain MRI data were quantified using a semi-automated local lesion threshold technique. The semi-automated segmentation was performed using the software NeuroLine (interactive system for neuroimaging segmentation and analysis), developed in our neuroimaging laboratory [18]. The examiner interacts with the program through markers (points or lines traced on the image). The segmentation method used was watershed transformation [19, 20], which is based on the gray level and at distance to the markers (for each point in the image). The examiner defines markers (for the semi-automated segmentation), parameters (for pre- and postprocessing) and contours (for manual segmentation in cases where the insertion of additional markers does not present satisfactory results). For each marker inserted or edited, the resulting contours are displayed over the original image. The presentation of the resulting contours is very quick, because the segmentation is applied just in the slice where the marker was traced. For identification of each structure to be segmented, the examiner can use labels associated with different marker colors.

The watershed approach, first introduced by Beucher and Lantuéjoul [21] and Beucher and Meyer [19], is one of the most powerful tools of mathematical morphology for image segmentation. Intuitively, the watershed algorithm can be compared with a flooding simulation. In this context, an input gray-scale image (generally the morphological gradient of the original data) is considered as a topographic surface where holes are punched in the marker regions. These regions can be found automatically or pointed out by the user. After associating each marker with a color, colored waters flow through the holes and enter the topography to inundate it at a uniform rate. Dams are built to prevent the merging of different colored waters. Finally, these dams form the watershed lines between the segmented regions also called 'catch-

Fig. 1. MRIs were obtained in a 2-tesla system in the transaxial plane, using semi-automatic segmentation of lesions. In details, sequence of tracing the regions of interest to segment the lesions of a patient with RRMS.



ment basins'. The classical watershed transformation occurs when the markers are the regional minima of the image. Thus, the semi-automatic approach offers repeatability, it is not very time consuming for the user and it is user guided, therefore accurate. In such interactive processes, reconstruction and visualization help the user to validate the segmentation results or correct them. The traditional approach for providing visual feedback to the user is to separate the interactive system into two independent processing components: segmentation and then visualization [20, 22–25].

Using a visual count method, the lesions were also analyzed through the work station in order to localize and measure the number of lesions by both semi-automated and visual methods. The proton density and T_2 -weighted images were scored according to the following items: number of frontal, parietal, temporal, occipital, infratentorial and basal ganglia (including internal capsule) lesions, number of periventricular lesions, number of callosal/subcallosal lesions and number of juxtacortical (contiguous with the cortex) lesions.

Lesions were identified and measured by one of the authors (H.H.R.) who was blinded to laboratory and clinical results (fig. 1).

Measurements of cerebral hemisphere volumes were performed using axial T_2 fast spin echo, 6-mm thick. The total brain parenchymal fraction (BPF) volume was quantified using a semi-

automated cerebral hemisphere threshold technique, through markers, using the same technique for brain lesion volume analysis described previously. Values <2 standard deviations from the mean of the control group were considered abnormal.

Statistical Methods

The Mann-Whitney test was used to compare continuous variables in relation to gender, and Spearman's correlation coefficient was used to assess the relationship between variables; a p value <0.05 was accepted as statistically significant. Statistical analyses were performed using the SAS System for Windows (Statistical Analysis System), 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, N.C., USA).

Results

Fifty patients with RRMS were evaluated (table 1). Measurement of BPF volume of MS patients was significantly lower than in healthy controls (mean $\pm$ SD BPF volume, 928.18 ± 93.88 and $1,115.2 \pm 131.32$, respectively; $p < 0.001$). Abnormalities compatible with demyelinating lesions were observed in MRI of 47 (94%) MS

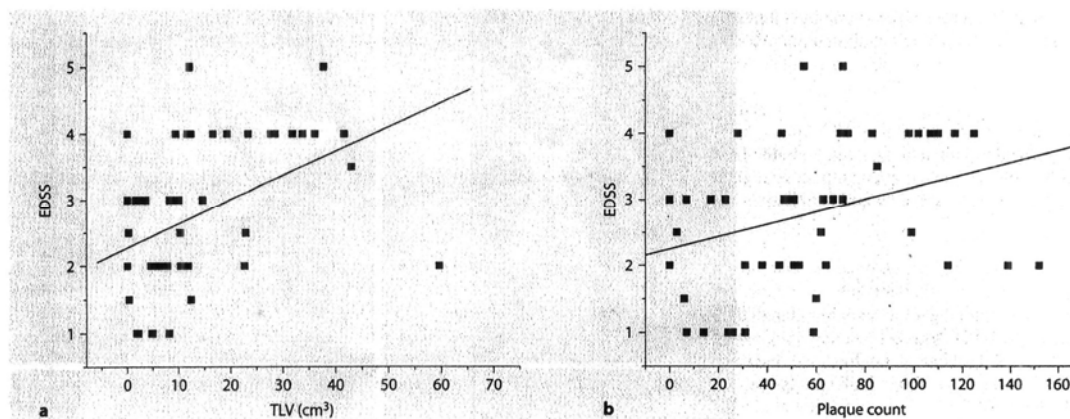


Fig. 2. Correlation between EDSS and brain TLV (a) and plaque count (b).

Table 1. Summary of clinical and laboratory data

Parameter	MS
Patients	50
Females/males	36/14
Age at onset, years	
Mean $\pm$ SD	30 $\pm$ 9.6
Range	10–46
Duration of disease, years	
Mean $\pm$ SD	10 $\pm$ 5.8
Range	1–29
EDSS score at onset	
Mean $\pm$ SD	2.7 $\pm$ 1.1
Range	0–5
IgG index	
Mean $\pm$ SD	1.0 $\pm$ 0.5
Range	0.4–2.4
Leukocytes	
Mean $\pm$ SD	8 $\pm$ 10.1
Range	1–51
Plaques	
Mean $\pm$ SD	56 $\pm$ 39.7
Range	0–152
Brain TLV, cm ³	
Mean $\pm$ SD	13.5 $\pm$ 13.4
Range	0–59.6
BPF volume, cm ³	
Mean $\pm$ SD	928.18 $\pm$ 93.8
Range	654.2–1,078.9
IgG index = (CSF IgG/serum IgG)/(CSF albumin/serum albumin).	

patients (fig. 1). Spinal cord lesions were present in 3 patients with negative brain MRI. Gadolinium-enhancing lesions were seen in 6 patients. These patients showed CSF pleocytosis and high IgG index values. Both brain TLV and total plaque count showed a statistically significant correlation with EDSS ($p = 0.0002$, $r = 0.5005$ and $p = 0.007$, $r = 0.38$, respectively) (fig. 2) as well as with the duration of the disease ($p = 0.0079$, $r = 0.37$ and $p = 0.038$, $r = 0.29$, respectively) (fig. 3). Corroborating data given by the semi-automated program, the visual analysis demonstrated that the number of periventricular and juxtacortical lesions was correlated with EDSS ($p = 0.0037$, $r = 0.4035$ and $p = 0.0305$, $r = 0.3063$, respectively), intrathecal IgG synthesis ($p = 0.0220$, $r = 0.3233$ and $p = 0.0056$, $r = 0.3860$, respectively) and total plaque count ($p = 0.0363$, $r = 0.2969$ and $p = 0.0094$, $r = 0.3638$, respectively). In addition, an inverse correlation between the duration of disease and CSF leukocyte count was observed ($p = 0.019$, $r = -0.33$) (fig. 4a). The IgG index was positively correlated with higher brain total lesion volume ($p = 0.043$, $r = 0.29$) (fig. 4b). However, no significant relationship was found among IgG index, EDSS score ($p = 0.61$, $r = 0.073$) and BPF volume ($p = 0.51$, $r = 0.095$). BPF volume was inversely correlated with disease duration and the number of relapses ($p = 0.0385$, $r = -0.293$ and $p = 0.0256$, $r = -0.315$, respectively). In contrast, no correlation was found among BPF volume, EDSS score ($p = 0.1949$, $r = -0.18642$) and total lesion volume ($p = 0.6605$, $r = -0.06366$).

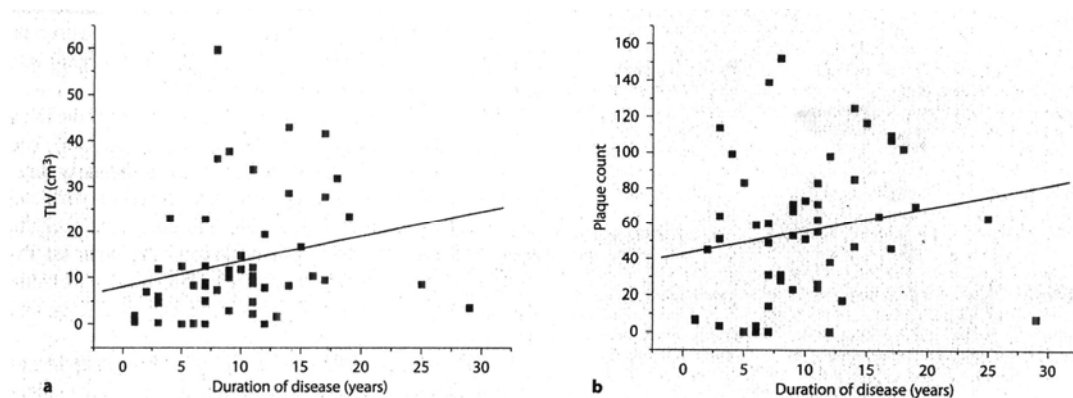


Fig. 3. Correlation between duration of disease and brain TLV (a) and plaque count (b).

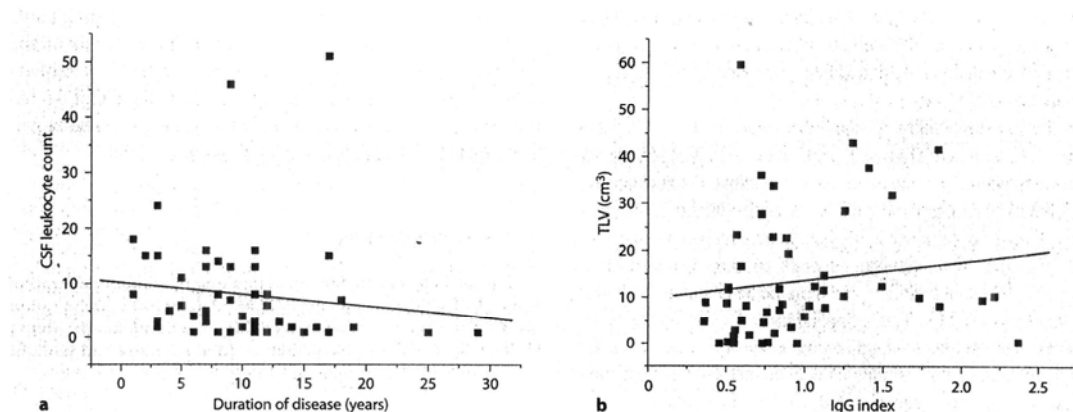


Fig. 4. Correlation between CSF leukocyte count and duration of disease (a), and between brain TLV and IgG index (b).

Pleocytosis (>5 leukocytes/mm³) was present in 22 (44%) patients, and high IgG index values (>0.7) were observed in 36 (72%) patients. Forty-two (84%) patients were oligoclonal IgG band positive. There was a positive correlation between CSF leukocyte count and IgG index ($p = 0.046$, $r = 0.284$) (fig. 5).

Discussion

The clinical points used to monitor the treatment in MS are the occurrence of relapses and the degree of disability, using EDSS [15]. Although these two parameters represent fundamental aspects of the disease, they are limited. Relapses are relatively rare events and involve some degree of subjectivity, and EDSS has low reproduc-

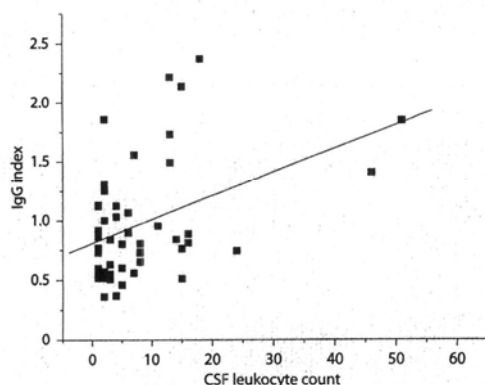


Fig. 5. Correlation between CSF leukocyte count and IgG index.

ibility and sensitivity [26, 27]. MRI has been an important tool as a secondary outcome measure in clinical trials, but conventional approaches offer only limited information [28, 29].

In the present study, we have focused on both CSF and brain MRI abnormalities in patients with RRMS in the remission phase of symptoms. We have demonstrated that RRMS patients with higher intrathecal IgG synthesis have a trend to present a higher brain lesion volume on MRI (fig. 4b). This finding seems to corroborate other studies [2, 30], concerning the role of antibodies to lesion development in MS. The correlation of MRI abnormalities with the intrathecal IgG synthesis rate was previously demonstrated in a series of 62 patients with clinically definite chronic progressive MS [31] and in patients in the early stages of active relapsing MS [32]. Although a significant correlation between intrathecal IgG synthesis and EDSS was not found, our results confirm the sensitivity of the CSF in the demonstration of the inflammatory process within the CNS, even when the disease is clinically in remission.

In the MS group under study, the brain atrophy was observed; however, the loss of parenchymal volume was not correlated with disability. Significant correlation between atrophy and other MR neuronal markers has supported that atrophy reflects the cumulative axonal damage [10]. The EDSS scale was positively correlated with the MRI measurement of the lesion load without correlation with atrophy. The absence of correlation with atrophy could be explained by the fact that the EDSS scale

mainly measures the motor component of clinical disability, but not the cortical functions. Previous observations have shown that lesion load in the first 5 years was more closely linked to brain atrophy [33].

Although the clinical relapse rate is less sensitive than MRI activity in the brain of MS patients [34], both the number and the volume of brain lesions in the early stages of the disease have been shown to correlate with the degree of future disability [35, 36]. The conflicting results reported between MRI and disability have been attributed to the poor sensitivity of the EDSS and to a possible impact of plasticity in determining the disability [37, 38].

The observation of brain atrophy in this group of patients without correlation with inflammatory parameters in the CSF requires additional studies in order to elucidate the role of inflammatory response in the neurodegeneration in MS.

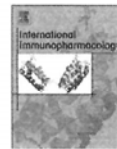
Our data emphasize the importance of intrathecal IgG synthesis as possible predictive value to brain lesion burden in the RRMS. Although additional longitudinal studies will be necessary to characterize the kinetics of the demyelination process and the axonal injury, a combination of new quantitative measures of MRI and CSF inflammatory parameters could be a powerful tool to understand the physiopathological aspects of MS.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from FAPESP (grant No. 00/07703-7, 01/12827-0), CNPq (grant 300375/84-87) and FAEP-UNICAMP. We thank Linda Gentry El-Dash for the English revision of the manuscript and Gislaïne C.L. Brito for the technical assistance.

References

- Ebers GC, Sadovnick AD, Rische NJ: A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 1995;377:150-151.
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, et al: Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999;5:170-175.
- Lassmann H: Pathology of multiple sclerosis; in Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Mathews B, Wekerle H (eds): *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London, Churchill Livingstone, 1998, pp 323-358.
- Miller DH, Grossman RI, Reingold SC, McFarland HF: The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis. *Brain* 1998;121:3-24.
- Atkins MS, Mackiewicz BT: Fully automatic segmentation of the brain in MRI. *IEEE Trans Med Imaging* 1998;17:98-107.
- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al: Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39:285-294.
- Mitchell JR, Karlik SJ, Lee DH, Fenster A: Computer-assisted identification and quantification of multiple sclerosis lesions in MR imaging volumes in the brain. *J Magn Reson Imaging* 1994;4:197-208.
- Bitsch A, Kuhlmann T, Stadelmann C, et al: A longitudinal MRI study of histopathologically defined hypointense multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001;49:793-796.
- Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD: Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology* 2001;57:1248-1252.
- De Stefano N, Narayana S, Francis GS, et al: Evidence of axonal damage in the early stage of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Arch Neurol* 2001;58:65-70.
- Izquierdo G, Angulo S, Garcia-Moreno JM, et al: Intrathecal IgG synthesis: marker of progression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2002;105:158-163.
- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, et al: Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* 2002;58:824-826.
- Villar LM, Masjuan J, González-Porqué P, et al: Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology* 2002;59:555-559.
- Poser CM, Paty DW, Scheinberg LC, et al: New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227-231.
- Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: the extended disability status scale. *Neurology* 1983;33:1444-1452.
- Link H, Tibbling G: Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. 3. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:397-401.
- Keir G, Luxton RW, Thompson EJ: Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990;27:436-443.
- Rondina JM, Cendes F, Lotufo RA: Desenvolvimento de um sistema semi-automático para a segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética. *Anais CBIS - VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde*, 2002.
- Beucher S, Meyer F: The morphological approach to segmentation: the watershed transform; in Dougherty ER (ed): *Mathematical Morphology in Image Processing*. New York, Marcel Dekker, 1993, chap 12, pp 433-481.
- Lotufo RA, Falcão AX: The ordered queue and the optimality of the watershed approaches; in Goutsias J, Vincent L, Bloembergen D (eds): *Mathematical Morphology and Its Application to Image and Signal Processing*. Dordrecht, Kluwer Academic, 2000, pp 341-350.
- Beucher S, Lantuejoul C: Use of watersheds in contour detection. *International Workshop on Image Processing, Real-Time Edge and Motion Detection/Estimation*, Rennes, 1979.
- Dougherty E, Lotufo R: *Hands-on Morphological Image Processing*. Bellingham, SPIE Press, 2003.
- Meyer F, Beucher S: Morphological segmentation. *J Vis Commun Image Processing* 1990;1:21-46.
- Audigier R, Lotufo RA, Falcão AX: 3D Visualization to Assist Iterative Object Definition from Medical Images. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 2006;30:217-230.
- Audigier R, Lotufo RA, Falcão AX: On integrating iterative segmentation by watershed with tridimensional visualization of MRIs. *XVII Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing*, Curitiba, Oct 2004. Curitiba, IEEE Press, 2004, pp 130-137.
- Filippi M, Horsfield MA, Adèr HJ, et al: Guidelines for using quantitative measures of brain magnetic resonance imaging abnormalities in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998;43:499-506.
- Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, et al: Patterns of disease activity in multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Br Med J* 1990;300:631-634.
- Miller DH, Barkhof F, Frank J, Parker GJM, Thompson AJ: Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002;125:1676-1695.
- Tedeschi G, Lavorgna L, Russo P, et al: Brain atrophy and lesion load in a large population of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2005;65:280-285.
- Baumhufner RW, Tourtellotte WW, Syndulko K, et al: Quantitative multiple sclerosis plaque assessment with magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 1990;47:19-26.
- Rudick R, Cookfair D, Simonian N, et al: Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNβ-1a) for relapsing multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;93:8-14.
- Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M: Intrathecal IgG synthesis and antibody-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;108:207-215.
- Chard DT, Brex PA, Ciccarelli O, et al: The longitudinal relation between lesion load and atrophy in multiple sclerosis: a 14 year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:1551-1554.
- Miller DH, Albert PS, Barkhof F, et al: Guidelines for the use of magnetic techniques in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:6-16.
- Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH: A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2002;346:158-164.
- O'Riordan JI, Thompson AJ, Kingsley DP, et al: The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up. *Brain* 1998;121:495-503.
- Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Nyul LG, Kolson DL: Brain atrophy in relapsing-remitting multiple sclerosis: fractional volumetric analysis of gray matter and white matter. *Radiology* 2001;220:606-610.
- Filippi M, Rocca MA: Disturbed function and plasticity in multiple sclerosis as gleaned from functional magnetic resonance imaging. *Curr Opin Neurol* 2003;16:275-282.



Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis

Sandra R. Mirandola^a, Dannie E.M. Hallal^a, Alessandro S. Farias^a, Elaine C. Oliveira^a, Carlos O. Brandão^a, Heloisa H. Ruocco^b, Benito P. Damasceno^b, Leonilda M.B. Santos^{a,*}

^a Neuroimmunology-Unit, Department of Genetics, Evolution and Biogenetics, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

^b Department of Neurology, Medical School, University of Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2007

Received in revised form 23 February 2009

Accepted 6 March 2009

Available online xxxxx

Keywords:

Cytokines

Myelin basic protein

Autoimmunity

ABSTRACT

Immunotherapy with Interferon-beta (IFN β) results in remarkably beneficial effects in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (MS), although the mechanisms by which it exerts these beneficial effects remain poorly understood. An investigation was made of the effects of IFN β on pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine production in peripheral blood cells in MS patients, both untreated and those undergoing immunotherapy, as well as in healthy controls.

Results show a significant increase in the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF α , IFN γ and IL-12 in the plasma and in the supernatant of leukocyte cultures from MS patients with the untreated disease; IFN β administration significantly reduced the levels of TNF α and IFN γ , with no changes in the level of IL-12. The interferon-beta therapy also led to a significant increase in the production of IL-10, as well as a slight increase in that of TGF β .

The reduction in pro-inflammatory cytokine production in the treated MS patient group, accompanied by a simultaneous increase in the production of anti-inflammatory cytokines and the reduction of relapse rates suggests that the beneficial effects of IFN β immunotherapy result, at least in part, from the modulation of cytokine patterns.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is the most common debilitating demyelinating disease that affects young adults [1]. Although there is no precise information about the prevalence of MS in Brazil, specialists are concerned with the increasing incidence of this disease in southern areas of the country where the population consists mainly of descendants of European immigrants.

MS is a chronic inflammatory disease characterized by lymphocyte infiltration and demyelination of the central nervous system. Auto-reactive T cells recognizing myelin components such as myelin basic protein (MBP) are thought to contribute to the pathogenesis of MS [2,3]. Although MS is a central nervous system (CNS) disease, myelin reactive T cells exist in an activated state in the peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS [4,5]. These activated T lymphocytes and macrophages produce cytokines that modulate the immune response, either positively or negatively. The balance between beneficial and deleterious effects of these cytokines depends on the context of the challenge facing the immune system.

Treatment with recombinant IFN β shows remarkably beneficial effects in the relapsing-remitting form of MS, leading to a reduction in both the severity and frequency of attacks [6–8]. Such clinical results have been confirmed by a significant reduction in the number of active lymphocytes and that of new lesions analyzed by magnetic resonance imaging [9]. The mechanisms of action underlying these beneficial effects of IFN β in MS, however, remain poorly understood, although they may be associated with the antagonizing effect of pro-inflammatory cytokines.

Interferons were initially tested as therapeutic agents for MS because of their antiviral properties and the hypothesis that MS was due to persistent viral infection. However, a pathogenic effect in MS patients who received recombinant IFN γ has previously been described [10]. The increase in frequency of exacerbation may be associated with the activation of monocytes/macrophages, as evidenced by the up-regulation of MHC class II antigen expression on these cells [11]. IFN γ also stimulates the expression of adhesion molecules on endothelial cells, thus promoting T cell homing and the activation of blood-derived macrophages and astrocytes to produce pro-inflammatory mediators such as TNF α [12].

The precise role of TNF α in the demyelinating process is complex, and although conflicting results have been observed in the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), most studies describe the deleterious effect of TNF α in EAE and MS.

* Corresponding author. Departamento de Genética, Evolução e Biogenética, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, CEP 13083-970, Brazil. Tel.: +55 19 35216262; fax: +55 19 35216276.

E-mail address: leonilda@unicamp.br (L.M.B. Santos).

1567-5769/\$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

Please cite this article as: Mirandola SR, et al, Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis, *Int Immunopharmacol* (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

Several lines of evidence implicate TNF α directly in the mediation of demyelination [13], and higher levels of TNF α have been found in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of patients in the active relapsing MS than in that of patients in remission of symptoms; moreover, it has been suggested that an increase in the production of TNF α precedes the clinical manifestation of a MS relapse [14,15].

IL-12 is produced by monocytes and dendritic cells and it is critical in Th1 polarization. There is also considerable evidence that IL-12 plays an essential role in the pathogenesis of EAE [16] and multiple sclerosis [17].

The increase in the production of cytokines with pro-inflammatory potential is generally accompanied by a concomitant increase in the production of cytokines with immunoregulatory properties such as IL-10 and TGF β [18]. IL-10 is identified as a factor produced by lymphocytes and macrophages which inhibits the cytokine synthesis of Th1 type lymphocytes, an effect attributed to the inhibition of the accessory function, including down-regulation of MHC class II expression, thus leading to impaired antigen presentation to reactive T cells [19].

Several studies have also indicated that TGF β is a potent immunosuppressive factor, affecting proliferation, activation and differentiation of the cells that participate in immunity. Its use in the treatment of EAE in rats and mice ameliorates the symptoms [20,21], and its appearance in the CNS is related to recovery from the disease [22].

This study investigates the role of IFN β in the production of pro and anti-inflammatory cytokines in the peripheral blood of Brazilian patients with the relapsing-remitting form of MS.

2. Materials and methods

2.1. Patients

The patients in this study were identified using the criteria of Poser et al. [23] to define MS. A total of 49 patients with stable relapsing-remitting MS, secondary progressive MS and primary progressive MS; 57 patients with relapsing-remitting MS in treatment with IFN β 1 β and 30 normal subjects were studied (Table 1). The control group was recruited from the local community and the individuals had no family history of neurological or psychiatric illness. Patients were chosen and Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores were assessed in sequential visits. None of the patients in any of the groups had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating blood for the study. The patients in the treated group had been receiving IFN β treatment, in standard doses, for 18–24 months. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Campinas–UNICAMP.

2.2. Antigen, antibody and recombinant cytokines

Polyclonal chicken anti-TGF β 1 antibody was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); purified bovine TGF β 1 and monoclonal mouse anti-TGF β 1 were provided by Genzyme, MA, USA, anti-mouse IgG peroxidase by Vector Burlingame, CA, USA and purified human TGF β by Sigma Chem., USA. The IL-12, IFN γ , TNF α and IL-10 were quantified using commercial kits from Biosource International, Nivelles, Belgium.

Human myelin basic protein was obtained according to Deibler et al. [24].

2.3. Proliferation assay and determination of cytokines synthesis

Peripheral Mononuclear blood cells were purified using a Ficoll–Hypaque gradient. The cells were suspended in Hank's balanced salt solution, washed before the addition of RPMI 1640 medium supplemented with 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, penicillin–streptomycin (Flow lab., USA), 12.5 mM HEPES buffer (pH = 7.4), 0.2% NaHCO $_3$ and 10% AB $^+$ human serum. The cells were then stimulated with either MBP (25 μ g/ml) or PHA (10 μ g/ml): 40 h for IL-10 and IFN γ production with stimulation with PHA, 60 h for IL-10 and IFN γ stimulated with MBP and 72 h for TGF β . For TNF α production the whole blood cells were stimulated with (100 ng/ml) for 20 h [14,25,30]. The IL-12 was quantified in the plasma of MS patients and healthy controls.

Capture ELISA assay for quantification of TGF β . TGF β was measured using a capture ELISA assay [25]. Polyclonal antibody to TGF β (obtained from R&D, MN, USA) at a level of 1 μ g/ml in PBS (pH 7.4) was added to 96-well microtiter plates (Immulon 1, Nunc, Roskilde, Denmark). After overnight incubation at 4 °C, the plates were washed three times with ELISA wash buffer (PBS containing 0.05% Tween 20) and blocked for 1 h with ELISA diluent (PBS containing 0.05% Tween 20 and 1% BSA). The plates were washed three times with wash buffer, and 100 μ l of standard, control, or sample were added to duplicate wells with overnight incubation at 4 °C. The plates were washed three times with wash buffer and incubated for 1 h at room temperature with monoclonal antibody (mAb) to TGF β (Genzyme MA, USA), 1 μ g/ml in ELISA buffer. The plates were washed three times with ELISA wash buffer and incubated an additional hour with biotinylated anti-mouse IgG (Vector, Burlingame, CA) 1:2000. Avidin–peroxidase complex and the substrate were then added. Orthophenylene diamine (Sigma Chem. MO, USA) prepared at 0.5 mg/ml in 0.05 M hydrogen peroxide was added for 30 min at room temperature and the optical density of the plates were read at 492 nm.

For quantification of IL-12, IFN γ , TNF α and IL-10 we employed commercial kits for human cytokines according to the instructions of

Table 1
Summary of clinical characteristics of MS patients.

Parameter	IFN β treated MS ^a	Untreated MS ^b	Healthy controls
N	57	49	30
Female/male	41/16	53/14	19/11
Age (years) mean $\pm$ SD	30 $\pm$ 9.6	46 $\pm$ 11.2	34 $\pm$ 4.0
Range	16–46	18–57	18–52
Duration of disease (years) mean $\pm$ SD	10 $\pm$ 5.8	17 $\pm$ 6.9	–
Range	3–24	11–24	–
EDSS ^c mean $\pm$ SD	4.3 $\pm$ 2.0	5.9 $\pm$ 1.8	–
Range	1.0–8.0	4.0–8.0	–
RRMS before treatment relapse rate/year	1.4 $\pm$ 1.0	–	–
RRMS patients in treatment relapse rate/year	0.4 $\pm$ 0.4	–	–

^a The treated MS group comprises relapsing-remitting multiple sclerosis.

^b The untreated group comprises stable relapsing-remitting multiple sclerosis; secondary progressive multiple sclerosis; primary progressive multiple sclerosis.

^c EDSS: Expanded Disability Status Scale.

Please cite this article as: Miranda SR, et al, Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis, Int Immunopharmacol (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

the manufacturer. Briefly, 96-wells microtiter plates were coated with 1–2 µg/ml of capture mAb for each cytokine in 0.1 M NaHCO₃ (pH = 8.5) overnight at 4 °C. Following blocking with 3% dry milk in PBS at room temperature for 2 h, samples and standard recombinant IFN γ , TNF α , IL-10 and IL-12 were added and incubated overnight at 4 °C. Then, 0.5–2.0 µg/ml of biotinylated detection mAb to human IL-12, IFN γ , TNF α , and IL-10 were added, followed by 1/400 avidin-peroxidase (Sigma Chem. MO, USA) and the peroxidase substrate; a stop solution was used, and the optical density of the plates was read at 492 nm.

2.4. Statistical analysis

The statistical significance of the results was determined by a Kruskal Wallis test. Data used include mean values and standard deviations (SD). A *p* value smaller than 0.05 was considered to be significant.

3. Results

3.1. Detection of IL-12 in the plasma of MS patients treated or not with IFN β and healthy controls

IL-12 was quantified in the plasma using ELISA assay and the levels detected (mean $\pm$ SD) were 446.2 $\pm$ 56.9 pg/ml for treated MS patients (*n* = 50), 552.4 $\pm$ 116.1 pg/ml for the untreated MS group (*n* = 27) and 231.2 $\pm$ 32.4 pg/ml for the healthy controls (*n* = 31); the level observed was significantly higher for both groups of MS patients (*p* < 0.01), with no significant difference between the treated and untreated groups (Fig. 1).

3.2. TNF α production in peripheral blood cells of MS patients with or without treatment with IFN β and healthy control

The whole blood cells of patients treated or not with IFN β were stimulated with LPS *in vitro*, and the TNF α in the plasma was quantified using an ELISA assay. For cells cultured without *in vitro* stimulation, the mean TNF α level was 403.9 $\pm$ 60.8 pg/ml, 97.8 $\pm$ 28.3 pg/ml, and 948.3 $\pm$ 107.2 pg/ml for treated MS patients (*n* = 19), healthy subjects (*n* = 19) and untreated MS patients (*n* = 19), respectively. TNF α production was significantly greater for both treated and untreated MS groups than that for the healthy controls (*p* < 0.001); moreover, this production was also significantly greater in

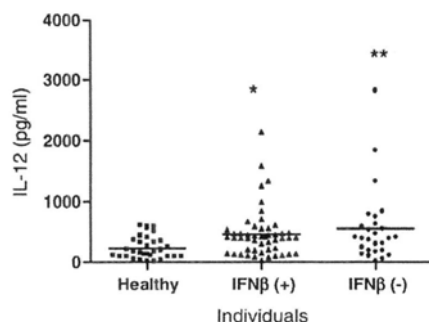


Fig. 1. Plasma concentrations of IL-12 in MS patients, both treated with IFN β and untreated, as well as healthy controls. Plasma from the three groups of individuals was collected and the IL-12 concentrations were detected by ELISA assay. The levels of the cytokine were significantly increased (**p* < 0.01) in both groups of MS patients.

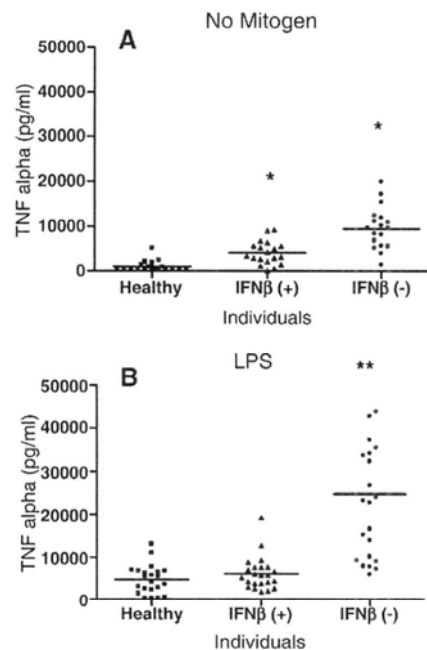


Fig. 2. Production of TNF α by MS patients treated with IFN β , untreated patients, and healthy controls. Whole peripheral blood cells were stimulated with LPS (100 ng/ml) for 20 h, and TNF α concentration was detected by ELISA assay. Results reflect difference between levels of stimulated and unstimulated cells. The levels of the cytokine were significantly increased (**p* < 0.001) in relation to healthy individuals and (***p* < 0.001) in relation to the other two groups of individuals.

untreated MS patients than in those submitted to IFN β treatment. (*p* < 0.001) (Fig. 2A).

TNF α was also quantified in the plasma after cells had previously been stimulated with LPS, with values of 613.7 $\pm$ 81.7, 2476.0 $\pm$ 318.9 pg/ml and 472.3 $\pm$ 73.6 pg/ml for treated MS patients (*n* = 23), untreated MS patients (*n* = 23) and healthy subjects (*n* = 22), respectively. Although the level in the treated group was not significantly different from that of the healthy controls (*p* > 0.05), that of the untreated group had undergone a significant increase (*p* < 0.001) (Fig. 2B).

3.3. IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from MS patients treated or not with IFN β and healthy control

For quantification of IFN γ level in the supernatant, mononuclear cells were subjected to one of two treatments: stimulation for 40 h with PHA (10 µg/ml) or 60 h with MBP (25 µg/ml); control cells were unstimulated. For unstimulated *in vitro* cells (Fig. 3), the mean production of IFN γ in the supernatant was 113.7 $\pm$ 13.7 pg/ml for treated MS (*n* = 20) and 56.9 $\pm$ 13.0 pg/ml for healthy controls (*n* = 20), showing a significant increase (*p* < 0.01) in MS group. In the supernatants from untreated MS (*n* = 19) the mean was 258.8 $\pm$ 38.5 pg/ml versus 56.9 $\pm$ 13.0 pg/ml for healthy controls, showing a significant increase (*p* < 0.001) in untreated MS group. Thus, both MS groups showed a significant increase in IFN γ production in relation to the level in healthy controls.

The effect of nonspecific mitogen (PHA) on IFN γ production was studied, in 23 patients treated with IFN β , 26 untreated patients and

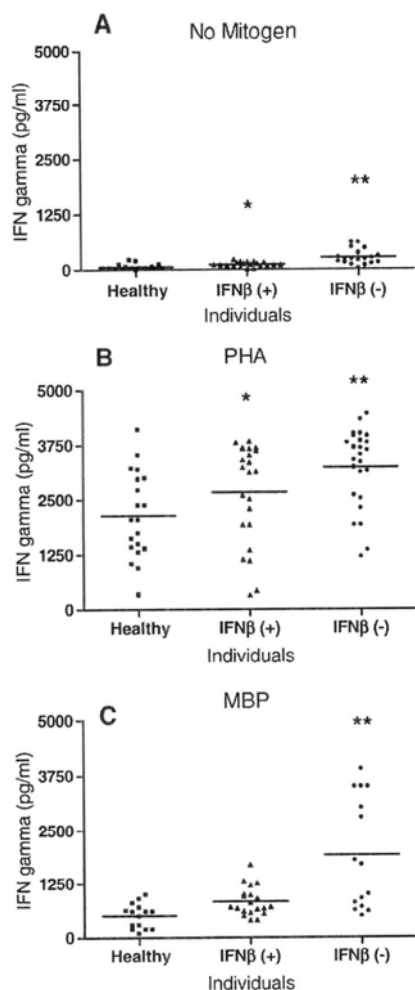


Fig. 3. Production of IFN γ by patients with MS treated with IFN β , untreated patients and healthy controls. Leukocytes were (A) cultured without antigen (B) stimulated in vitro with PHA (10 μ g/ml) or (C) with MBP (25 μ g/ml); IFN γ was detected by ELISA assay in supernatants after 40 h stimulated with PHA and 60 h stimulated with MBP culture. Results reflect difference between levels of stimulated and unstimulated cells. The levels of the cytokine were significantly increased (* $p < 0.001$) in relation to healthy individuals and (** $p < 0.001$) in relation to the two groups studied.

20 healthy controls. For treated MS patients the mean level of IFN γ was 2663.6 ± 237.0 pg/ml, while that for healthy subjects was 2138.3 ± 220.0 pg/ml, a non-significant difference ($p > 0.05$). For the untreated MS group, however, the mean of 3239.5 ± 173.7 pg/ml was significantly higher than that of the healthy controls (2138.3 ± 220.0 pg/ml) ($p < 0.01$) (Fig. 3B). The stimulation with MBP results in IFN γ levels of 824.5 ± 75.3 pg/ml, 507.3 ± 72.0 pg/ml, and 1922.0 ± 335.0 pg/ml for treated MS ($n = 15$), healthy subjects ($n = 15$) and untreated MS ($n = 15$), respectively. The production of IFN γ was significantly greater in the untreated group than in the control ($p < 0.001$), with no significant difference ($p > 0.05$) between treated group and the healthy donor controls (Fig. 3C).

3.4. IL-10 production by peripheral blood mononuclear cells from MS patients treated or not with IFN β and healthy control

The level of IL-10 produced by mononuclear cells, both with and without stimulation with PHA (40 h) or MBP (60 h) was quantified by a capture ELISA assay. The mean IL-10 production of unstimulated cells in the treated group ($n = 50$) was 115.8 ± 6.3 pg/ml, a significant increase ($p < 0.001$) over the 73.7 ± 8.0 pg/ml of the healthy controls ($n = 22$). For the untreated group ($n = 30$) there was significant decrease ($p < 0.001$) to 41.2 ± 3.5 pg/ml (Fig. 4A).

After in vitro PHA stimulation, the mean IL-10 production was 166.9 ± 11.6 pg/ml, 153.1 ± 13.9 pg/ml, and 151.8 ± 9.3 pg/ml for

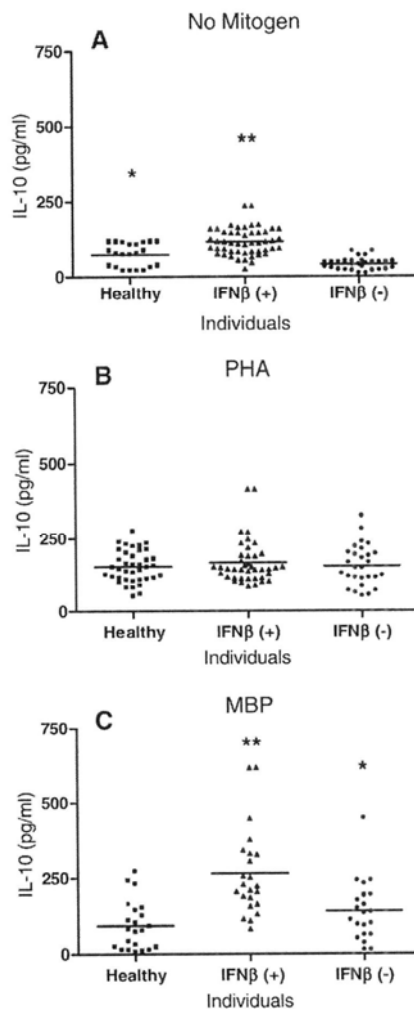


Fig. 4. Production of IL-10 by MS patients treated with IFN β , untreated patients, and healthy controls. Leukocytes were (A) cultured without mitogen (B) stimulated with PHA (10 μ g/ml) or (C) with MBP (25 μ g/ml); IL-10 was detected by ELISA assay in the supernatants after 40 h culture with PHA and 60 h stimulated with MBP. Results reflect difference between levels of stimulated and unstimulated cells. The levels of the cytokine were significantly increased (* $p < 0.001$) in relation to healthy individuals and (** $p < 0.001$) in relation to the two groups studied.

Please cite this article as: Mirandola SR, et al, Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis, Int Immunopharmacol (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

treated MS group ($n=41$), untreated MS patients ($n=28$) and healthy subjects ($n=30$), respectively. These differences were not significant ($p>0.05$) (Fig. 4B).

In vitro stimulation with MBP (25 $\mu\text{g/ml}$), however, led to mean IL-10 levels of 264.5 ± 30.0 pg/ml for treated individuals ($n=23$) and 140.6 ± 21.8 pg/ml for untreated MS patients ($n=23$), both values being significantly greater than the 93.7 ± 17.1 pg/ml of the 22 healthy subjects ($p<0.001$ and 0.05 , respectively) (Fig. 4C).

3.5. TGF β production by peripheral blood mononuclear cells from MS patients treated or not with IFN β and healthy control

The TGF β level in cells with and without stimulation with PHA for 72 h was quantified by a capture ELISA assay. The analysis of the supernatant of unstimulated cells showed no significant differences ($p>0.05$) between the three groups of individuals: 67.1 ± 4.8 pg/ml, 64.2 ± 6.9 pg/ml, and 65.9 ± 11.0 pg/ml for treated ($n=10$) and untreated MS patients ($n=19$) and healthy individuals ($n=13$), respectively. (Fig. 5A).

After stimulation, however, these levels increased to 2763.0 ± 324 pg/ml, 2660.5 ± 52.0 pg/ml and 2485.0 ± 92.4 pg/ml for treated MS patients ($n=32$), untreated MS patients ($n=33$) and healthy subjects ($n=27$), respectively; with the increase for the treated MS group being significant ($p<0.01$), although that for the untreated group was not ($p>0.05$) (Fig. 5B).

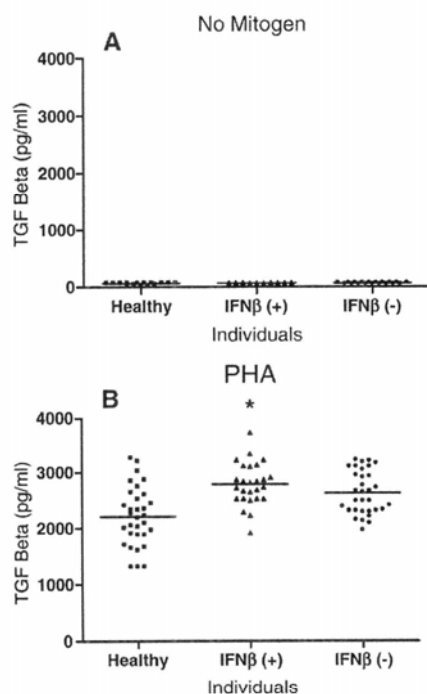


Fig. 5. Production of TGF β by MS patients treated with IFN β , untreated patients, and healthy controls. Leukocytes were (A) cultured without antigen, and (B) stimulated with PHA (10 $\mu\text{g/ml}$). TGF β was detected by ELISA assay in the supernatants after 60 h culture. Results reflect difference between levels of stimulated and unstimulated cells. The levels of the cytokine were significantly increased. (* $p<0.01$) in relation to healthy individuals.

4. Discussion

Our data have demonstrated that there are changes in the cytokine secretion patterns of the peripheral blood cells of patients with the relapsing-remitting form of MS treated with IFN β for 18–24 months. Although in MS the immune response is localized in the CNS, immune abnormalities correlated with the activity of the disease are also found in the peripheral immune compartment, [3,26] which justifies the quantification of cytokines in the plasma or in the supernatant of peripheral leukocytes culture. Many cells both within and outside the immune system are responsible for the production of cytokines, so both pro and anti-inflammatory cytokines were quantified, regardless of the cells producing them.

The present study has demonstrated a significant increase in the level of pro-inflammatory cytokines produced either by macrophages or dendritic cells such as IL-12 and TNF α or by T lymphocytes such as IFN γ . IL-12 is considered a critical pro-inflammatory cytokine in multiple sclerosis, as well as in its animal model (EAE). In this paper, an increase in the production of this cytokine was observed in the serum of both treated and untreated MS patients in relation to healthy controls. Previous studies found a similar increase in progressive MS [27–29], and increased frequencies of IL-12-secreting monocytes appear to correlate with active brain lesions detected by magnetic resonance imaging [30,31]. No reduction in IL-12 level after IFN β treatment was found here. The lack of in vivo effect of the IFN β therapy on IL-12 levels was also previously demonstrated [32]. On the other hand, it has been clearly demonstrated that the level of TNF α decreased significantly in the group of MS patients treated with IFN β , with or without LPS stimulation, a beneficial effect that has previously reported [33–36]. The reduction, in the level of this mediator may explain the beneficial effects of IFN β treatment; since TNF α is a major inducer of endothelial adhesion molecules and chemokines, it may play a role in the recruitment of autoreactive lymphocytes for the central nervous system [11]; moreover, it may have a direct toxic effect on myelin [37,38].

The study reported here shows that the administration of IFN β also leads to a significant reduction in the level of IFN γ , whether or not cells have been stimulated with nonspecific mitogen or MBP. The MBP was used in order to activate the autoreactive T lymphocytes. In previous study, we have shown that untreated MS patients evidence a greater lymphocyte proliferative response to myelin and MBP than did the normal healthy controls [25]. These results match the findings of others that demonstrated the presence of activated T cells specifically recognizing myelin antigen in the peripheral blood cells in MS patients, although the antigenic target was confined to the CNS [4,5]. The present data is in agreement with previous reports showing that immunotherapy with IFN β significantly reduces the production of pro-inflammatory cytokine by the autoreactive T lymphocytes, thus contributing to the reduction in the inflammatory response in the CNS [39,40].

One plausible hypothesis for the efficacy of the IFN β mechanism in MS would be that IFN β stimulates the expression of soluble cytokines with immunosuppressive properties. Here we have demonstrated that the spontaneous production of IL-10 is significantly reduced in the group of untreated MS patients, whereas the level of spontaneous production of this cytokine is increased in the treated patients. These results are in agreement with many studies that have shown higher levels of IL-10 in plasma and peripheral blood leukocytes of treated MS patients than those of untreated patients. The increased IL-10 production observed with in vitro stimulation with MBP suggests that neuroantigen-specific T lymphocytes could be a major source of IL-10 in treated patients. Production of anti-inflammatory cytokines by T cell clones sensitized to proteolipid protein (PLP) from MS patients has also been observed [41]. These results suggest that the stimulation of lymphocytes-secreting IL-10 in the CNS may explain the beneficial effect of the treatment with IFN β . This hypothesis is

Please cite this article as: Mirandola SR, et al, Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis, Int Immunopharmacol (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

supported by previous reports showing that IL-10 mRNA expression was significantly higher in the brain of mice with EAE in clinical remission [42]. Moreover, suppressor determinants on the MBP molecule have been shown to stimulate preferentially the production of suppressive cytokines, such as TGF β [43]. Although increased levels of IL-10 were detected after IFN β treatment, TGF β production was minimal. Previous studies have demonstrated that TGF β was decreased in the peripheral blood mononuclear cells of MS patients with the relapsing-remitting form of MS and it increased after therapy with IFN β [32], a finding confirmed by the results reported here. Similar results were also observed with another therapeutic approach to the treatment of MS, such as oral tolerization with bovine myelin, which also increased the frequency of TGF β secreting T cell lines in response to neuroantigen (MBP and PLP) [44]. Since TGF β has a potent immunosuppressive effect, it is possible that even at such moderate levels, this cytokine may have an important physiological effect.

This paper as a whole presents evidence of a significant increase in the production of IL-12, TNF α and IFN γ in the peripheral blood cells of patients with untreated MS, as well as a significant reduction in that of TNF α and IFN γ in the treated MS group. The reduction in the production of pro-inflammatory cytokines was accompanied by an increase in the production of IL-10 and TGF β and a reduction of annual relapse rates (Table 1), an observation that emphasizes the immunoregulatory properties of IFN β .

These findings confirm that a therapeutic approach favorable to the production of anti-inflammatory cytokines, such as immunotherapy with IFN β , can be used to interrupt the cascade of events leading to the chronic inflammation of Multiple Sclerosis.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support of the Foundation for the Support Research of the State São Paulo (FAPESP); the Brazilian Research Council (CNPq) and (FAEP-UNICAMP), as well as the collaboration of Linda Gentry El-Dash in the linguistic revision of the manuscript.

References

- [1] Hafler DA, Slavik JM, Anderson DE, O'Connor KC, De Jager P, Baecher-Allan C. Multiple sclerosis. *Immunol Rev* 2005;204:208–31 Review.
- [2] Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23: 683–747 Review.
- [3] Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler D. T cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 1990;346:183–7.
- [4] Hafler DA, Weiner HL. MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunol Today* 1989;10:104–7.
- [5] Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 1994;179:973–84.
- [6] Buttmann M, Rieckmann P. Interferon-beta1b in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2007;7:227–39 Review.
- [7] De Jager PL, Hafler DA. New therapeutic approaches for multiple sclerosis. *Annu Rev Med* 2007;58:417–32 Review.
- [8] Filippini G, Munari L, Incorvaia B, Polman C, Dámico R, Rice GP. Interferons in relapsing remitting multiple sclerosis: a systematic review. *Lancet* 2003;361: 545–52.
- [9] Calabresi PA, Stone LA, Bash CN, Frank JA, McFarlan HF. Interferon beta results in immediate reduction of contrast-enhanced MRI lesions in multiple sclerosis patients followed by weekly MRI. *Neurology* 1997;48:1446–8.
- [10] Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP. Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 1987;37:1097–102.
- [11] Dettl M, Scheidt P, Prange H, Kirchmer H. Correlation between interferon production and clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 1997;17:293–300.
- [12] Hartung HP, Reiners K, Archelos JJ, Michels M, Heidenreich F, Pflughaupt KW, et al. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor in multiple sclerosis: correlation with magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 1995;38:186–93.
- [13] Selma JW. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor approach to inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Ann Rheum Dis* 2000;59:94–102.
- [14] Chofflon M, Jillard C, Gauthier G, Grau G. Tumor necrosis factor production as possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 1992;433:523–31.
- [15] Brandao CO, Ruocco HH, Farias Ados S, Oliveira C, Hallal-Longo DE, Mirandola SR, et al. Cytokines and intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis patients during clinical remission. *Arq Neuro-psiquiatr* 2005;63:914–9.
- [16] Smith T, Hewson AK, Kingsley CI, Leonard JP, Cuzner ML. Interleukin 12 induces relapse in experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rats. *Am J Pathol* 1997;150:1909–17.
- [17] Windhagen A, Newcombe J, Dangond F, Strand C, Woodroffe MN, Cuzner ML, et al. Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *J Exp Med* 1995;182:1985–96.
- [18] Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ. Cytokines in Multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 2005;106:167–77.
- [19] Segal BM, Dwyer BK, Shevach EM. An interleukin (IL-10/IL-12) immunoregulatory circuit controls susceptibility to autoimmune disease. *J Exp Med* 1998;187:537–46.
- [20] Zhang X, Reddy J, Ochi H, Frenkel D, Kuchroo VK, Weiner HL. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4+LAP+ and CD4+CD25+ T cells. *Int Immunol* 2006;18: 495–503.
- [21] Yasuda CL, Al-Sabbagh A, Oliveira EC, Diaz-Bardales BM, Garcia AA, Santos LM. Interferon beta modulates experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the pattern of cytokine secretion. *Immunol Invest* 1999;28:115–26.
- [22] Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of Transforming Growth Factor b, Interleukin4, and Prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992;176:1344–64.
- [23] Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227–31.
- [24] Deibler GE, Martenson RE, Kies MW. Large scale preparation of Myelin Basic Protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep Biochem* 1972;2:139–65.
- [25] Santos LMB, Al-Sabbagh A, Londono A, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF β secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. *Cell Immunol* 1994;157:439–47.
- [26] Hallal-Longo DE, Mirandola SR, Oliveira EC, Farias AS, Pereira FG, Metzke IL, et al. Diminished myelin-specific T cell activation associated with increase in CTLA4 and Fas molecules in multiple sclerosis patients treated with IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res* 2007;27:865–73.
- [27] Comabella M, Balashov KE, Issazadeh S, Smith D, Weiner HL, Khoury SJ. Elevated interleukin-12 in progressive multiple sclerosis correlates with disease activity and is normalized by pulse cyclophosphamide therapy. *J Clin Invest* 1998;102:671–8.
- [28] Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4 T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:599–603.
- [29] Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 1996;138:138–46.
- [30] Costa PM, Yasuda CL, Scaglioni SM, Diaz-Bardales BM, Maciel E, Damasceno BP, et al. Pattern of Cytokines Secretion by peripheral blood cells of patients with Multiple Sclerosis in Brazil. *Mult Scler* 2000;6:293–9.
- [31] Makhlof K, Weiner HL, Khoury SJ. Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol* 2001;119:145–9.
- [32] J. Losy and G. Michalowska-Wender. In vivo effect of interferon-beta 1a on interleukin-12 and TGF-beta(1) cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. 2002; 106:44–46.
- [33] Jensen J, Draukauer M, Sellebjerg F. Cytokines and adhesion molecules in multiple sclerosis patients treated with interferon beta1b. *Cytokine* 2005;29:24–30.
- [34] Probert L, Akassoglou K, Pasparakis M, Kontogeorgos G, Kollias G. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:11294–8.
- [35] Ozenci V, Koutwenhoven M, Huang YM, Kivisakk P, Link H. Multiple sclerosis is associated with an imbalance between tumour necrosis factor-alpha (TNF alpha) and IL-10 secreting blood cells that is corrected by interferon-beta (IFN-beta). *Clin Exp Immunol* 2000;120:147–53.
- [36] Sarchielli P, Critelli A, Greco L, Sokola E, Floridi A, Gallai V. Expression of TNF-alpha mRNA by peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients treated with IFN-beta 1A. *Cytokine* 2001;14:294–8.
- [37] Rieckmann P, Albrecht M, Kitz B, Tumani H, Brooks A, Luer W, et al. Tumor necrosis factor a messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Ann Neurol* 1994;37:227–57.
- [38] Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor α and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991;325:467–72.
- [39] Furlan R, Bergami A, Lang R, Brambilla E, Franciotta D, Martinelli V, et al. Interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients decreases the number of circulating T cells producing interferon-gamma and interleukin-4. *J Neuroimmunol* 2000;111:86–92.
- [40] Peteret HF, Nolden S, Schoppe S, Bamborschke S, Pukrop R, Heiss WD. Low interferon gamma producers are better treatment responders: a two-year follow-up of interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2002;8:492–4.
- [41] Correale J, Gilmore W, McMillan M, Mc Carthy K, Thy L, Weiner L. Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol* 1995;154:2959–68.

Please cite this article as: Mirandola SR, et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol* (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

- [42] Kennedy MK, Torrence DS, Pichia KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol* 1992;149:2496–505.
- [43] Miller A, Al-Sabbagh A, Santos LMB, Prabhu Das M, Weiner HL. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor β after antigen-specific triggering. *J Immunol* 1993;151:7307–15.
- [44] Hafler DA, Kent SC, Pietrusewicz MJ, Khoury SJ, Weiner HL, Fukaura H. Oral administration of myelin induces antigen-specific TGF- β 1 secreting T cells in patients with multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1997;835:120–31.

Please cite this article as: Mirandola SR, et al, Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis, *Int Immunopharmacol* (2009), doi:10.1016/j.intimp.2009.03.004

ANEXO 4- Artigo submetido ao periódico Journal of Neuroimmunology 2009

Quantitative MRI and CSF inflammatory mediators in a sample of brazilian multiple sclerosis population: a prospective study

Ruocco HH, Brandão CO, Cendes F, Damasceno BP, Santos LMB

From the Neuroimmunology- Unit 1- Department of Microbiology and Immunology 2- Department of Neurology- Medical School – University of Campinas – UNICAMP – Campinas – SP- Brazil

Running title: CSF and brain MRI in prospective study of multiple sclerosis

Key words: brain parenchymal fraction cerebrospinal fluid imaging brain total lesion volume · intrathecal IgG synthesis · magnetic resonance · prospective study multiple sclerosis ·

Address for correspondence:

Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP- Brazil- CEP 13083-970 – FAX # 55.19. 35216276
Phone: 55.19.35216262. E-mail:heloruocco@gmail.com; leonilda @unicamp.br

Abstract

Looking at the need for alternative strategies for multiple sclerosis patients, who do not respond satisfactorily to current treatments, both quantitative MRI and CSF inflammatory parameters were used in order to provide information about the clinical evolution of MS and their potential role for evaluating the response of the patients to immunomodulatory treatment. Therefore, a longitudinal study of 54 RRMS patients was made after an average of 6.3 ± 2.7 years. MRIs were performed and CSF samples were collected both during the diagnostic process and after immunomodulator treatment (beta interferon and glatiramer acetate).

Demyelinating lesions were detected by MRI in 94.4% and the presence of oligoclonal bands were observed in 83% of patients. During the evolution of the disease, it was possible to establish a positive correlation of IgG index with lesion total volume and total leukocytes count. Brain atrophy was observed since the diagnosis of disease. There was also an inverse correlation of duration of the disease with both total leukocytes count and brain volume. The number of relapses was also inversely correlated to the brain volume and this one decreased after treatment.

Our results indicate that the high intrathecal IgG synthesis observed in the RRMS patients may predict a greater brain lesion burden and that the treatment with immunomodulator induces a significant reduction of annual relapse rate.

Introduction

Despite Multiple Sclerosis' pathological and clinical features as well as the inflammatory aspects had been widely studied, little is known about the disease's prognostic. Therefore, the search for biological markers of disease activity and the knowledge of prognostic factors, which can predict the clinical course of a more specific and effective therapy is still necessary.

The prevalence of Multiple Sclerosis (MS) has a considerable variability all over the world. According to Kurtzke, South America is considered to have low prevalence (minor than 5 cases: 100000 habitants) (1).

The pathological hallmarks of MS lesions in brain and spinal cord are inflammation, demyelination, axon loss and gliosis (2,3). Recent studies revealed heterogeneity in the mechanisms leading to the formation of lesions (4,5,6) and this one is not only observed in its clinical presentation, but also in the profile of the immunopathological event evidenced by different patterns of demyelinating lesions at the neuroimaging studies (7). Simultaneously, axonal destruction and neuronal loss occur early during multiple sclerosis as a consequence of the extensive inflammatory response (9-13).

Although MS treatment has progressed significantly, there are patients who still do not respond satisfactorily to current therapies, in part as a consequence of disease heterogeneity due to probably several genes interaction in polygenetic disorder (14). Thus, there are several remaining challenges for this approach to be effective.

As MS is a chronic disease with a relatively early age at onset and is part of a differential diagnosis spectrum with tropical infectious diseases in our environment, the importance some tools for diagnosis and follow-up of these patients is crucial. Regarding to this concept, the lesion load measurements by MRI associated with intrathecal IgG synthesis could be good quantitative indicators of disease's activity, and the brain volume could be potentially the promising biomarker of chronic tissue loss, justifying our study.

Patients and Methods

Patients

Patients with clinically definite MS attended at our university hospital, between 1997 and 2005 were studied. The study was approved by the Ethics Committee of our Institution, and informed consent was obtained for all patients. Patients were chosen during diagnostic determination in sequential visits. A total of 54 patients (37 women and 17 men), with ages ranging from 10 to 46 years (mean age of 30 years), all with the relapsing-remitting (RR) form of the disease, according to the Poser's criteria (14), were included in the study. MRI and laboratory investigations were performed when patients experienced remission of symptoms and before any chronic immunomodulating or immunosuppressive treatment. The Expanded Disability Status Scale (EDSS) score was assessed at lumbar puncture (15). The delay between the first attack and the lumbar puncture was 4.0 years. Neurological exams were performed in all patients by the same investigator who was blinded to laboratory and clinical results.

Twenty healthy volunteers (9 men and 11 women), with ages ranging from 20 to 62 years (mean age of 32 years) were studied as a control group for MRI. The normal control group was used only to compare the brain atrophy component. They were recruited from the local community and had no family history of neurological or psychiatric illness.

Patients with significant comorbidities, such as alcoholism, head injury, arterial hypertension, diabetes mellitus, stroke, drug abuse, and malignancy were excluded.

Serum and CSF samples

All specimens were obtained after the first consultation for routine determination of CSF leukocyte count and IgG synthesis. None of the patients had received corticosteroids or other immunosuppressive drugs during a period of at least 6 months prior to donating CSF and blood for the study.

Laboratory procedures

IgG and albumin in the CSF and serum were measured by nephelometry (BNII; Dade Behring, Marburg, Germany), and IgG Indexes were calculated according to the literature (16). Oligoclonal IgG bands (OCB) were identified by isoelectrofocusing (17).

Imaging

MRI examinations were performed using a 2.0-tesla system (Elscent, Prestige, Haifa, Israel). All exams covered the whole brain and sections were made in the coronal, sagittal and axial planes. MRI acquisition parameters for images used for analysis include: (1) T 1 sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, repetition time (TR) 550 ms, echo time (TE) 12 ms, matrix 270 x 200; (2) T 1 axial images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 300 x 210; (3) T 2 sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 6,600 ms, TE 128 ms, matrix 320 x 252; (4) axial double echo images, proton density weighted, 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 16 ms, matrix 256 x 256; T 2 , 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 128 ms, matrix 256 x 256; inversion time 2,550 ms; (5) axial flair images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 10,099 ms, TE 90 ms, matrix 250 x 250; (6) coronal T1, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 270 x 200. (7) axial T1 gradient echo, 3mm thick (flip angle, 70°; TR, 200; TE, 5; matrix, 180x232; FOV, 22x22 cm); (8) axial T2 fast spin-echo, 4mm thick (flip angle, 120°; TR, 6800; TE, 129; matrix, 252x328; FOV, 21x23 cm) (9) volumetric (3-dimensional) T1 gradient echo, acquired in the sagittal plane for multiplanar reconstruction, 1 mm thick (tip angle, 35°, TR, 22; TE, 9; matrix, 256x220; FOV, 23x25 cm). Administration of 0.1 mmol/kg of gadolinium- DTPA was used.

Brain MRI data were quantified using a semi-automated local lesion threshold technique. A semi-automated segmentation was performed using the software NeuroLine (interactive system for neuroimaging segmentation and analysis), developed in our neuroimaging laboratory (18). The examiner interacts with the program through markers (points or lines traced on the image).

The segmentation method used was watershed transformation (19, 20), which is based on the gray level and at distance to the markers (for each point in the image). The examiner defines markers (for the semi-automated segmentation), parameters (for pre- and postprocessing) and contours (for manual segmentation in cases where the insertion of additional markers does not present satisfactory results). For each marker inserted or edited, the resulting contours are displayed over the original image. The presentation of the resulting contours is very quick, because the segmentation is applied just in the slice where the marker was traced. For identification of each structure to be segmented, the examiner can use labels associated with different marker colors.

The watershed approach, first introduced by Beucher and Lantuéjoul (21) and Beucher and Meyer (19), is one of the most powerful tools of mathematical morphology for image segmentation. Intuitively, the watershed algorithm can be compared with a flooding simulation. In this context, an input gray-scale image (generally the morphological gradient of the original data) is considered as a topographic surface where holes are punched in the marker regions. These regions can be found automatically or pointed out by the user. After associating each marker with a color, colored waters flow through the holes and enter the topography to inundate it at a uniform rate. Dams are built to prevent the merging of different colored waters. Finally, these dams form the watershed lines between the segmented regions also called 'catch-ment basins'. The classical watershed transformation occurs when the markers are the regional minima of the image. Thus, the semiautomatic approach offers repeatability, it is not very time consuming for the user and it is user guided, therefore accurate. In such interactive processes, reconstruction and visualization help the user to validate the segmentation results or correct them. The traditional approach for providing visual feedback to the user is to separate the interactive system into two independent processing components: segmentation and then visualization (20, 22– 25).

Using a visual count method, the lesions were also analyzed through the work station in order to localize and measure the number of lesions by both semi-automated and visual methods. The proton density and T 2-weighted images were scored according to the following items: number of frontal, parietal, temporal, occipital, infratentorial and basal ganglia (including internal capsule) lesions, number of periventricular lesions, number of

callosal/ subcallosal lesions and number of juxtacortical (contiguous with the cortex) lesions.

Lesions were identified and measured by one of the authors (H.H.R.) who was blinded to laboratory and clinical results (fig. 1).

Measurements of cerebral hemisphere volumes were performed using volumetric (3-dimensional) T1 gradient echo. The total brain parenchymal fraction (BPF) volume was quantified using a semiautomated cerebral hemisphere threshold technique, through markers, using the same technique for brain lesion volume analysis described previously. Values < 2 standard deviations from the mean of the control group were considered abnormal.

Both laboratorial tests and the acquisition images through by MRI were performed at the remission phase of the clinical symptoms in all the patients of this group in two different times: (1) during the disease investigation, before the beginning of any immunomodulator or immunosuppressive treatment; (2) after the treatment with immunomodulators (beta interferon and glatiramer acetate) for at least three years.

Statistical methods

Statistical significance of the results was determined using a non-parametric variance analysis, Kruskal-Wallis test and Spearman Rank test.

Mann Whitney test was used to compare continuous variables in relation to patient genders, and Spearman correlation coefficient to assess the relationship between variables; a p value of <0.05 was accepted as statistically significant. The analysis was done correcting all the differences the evolution course, using the original data as the one with the correction by the time of the following up. Statistical analyses were performed using the SAS System for Windows (Statistical Analysis System), 8.02. SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.

Results

Fifty four patients with RRMS were evaluated (Table 1). Measurement of brain parenchymal fraction (BPF) volume of MS patients was significantly lower than in healthy controls (mean $\pm$ SD BPF volume, 928.18 ± 93.88 and 1115.2 ± 131.32 , respectively; $p < 0.001$). Abnormalities compatible with demyelinating lesions were observed in MRI of 51 (94.4%) MS patients (Fig. 1). Spinal cord lesions were present in three patients (5.6%) with negative brain MRI. These patients showed CSF pleocytosis and high IgG index values. Both brain total lesion volume (TLV) and total plaque count showed a statistically significant correlation with EDSS ($p = 0.0002$, $r = 0.5005$ and $p = 0.007$, $r = 0.38$, respectively) (Fig. 2A, 2B) as well as the duration of disease ($p = 0.0079$, $r = 0.37$ and $p = 0.038$, $r = 0.29$, respectively) (Fig. 3A, 3B). Corroborating with data given by semi- automated program, the visual analysis demonstrated that the number of periventricular and juxtacortical lesions were correlated with EDSS ($p = 0.0037$, $r = 0.4035$; $p = 0.0305$, $r = 0.3063$, respectively), intrathecal IgG synthesis ($p = 0.0220$, $r = 0.3233$; $p = 0.0056$, $r = 0.3860$, respectively) and total plaque count ($p = 0.0363$, $r = 0.2969$; $p = 0.0094$, $r = 0.3638$, respectively). In addition, an inverse correlation between the duration of disease and CSF leukocyte count was observed ($p = 0.019$, $r = -0.33$) (Fig. 4A). IgG index was positively correlated with higher brain total lesion volume ($p = 0.043$, $r = 0.29$) (Fig. 4B). However, no significant relationship was found among IgG index, EDSS score ($p = 0.61$, $r = 0.073$) and BPF volume ($p = 0.51$, $r = 0.095$). BPF volume was inversely correlated to disease duration and the number of relapses ($p = 0.0385$, $r = -0.293$ and $p = 0.0256$, $r = -0.315$, respectively). In contrast, no correlation was found among BPF volume, EDSS score ($p = 0.1949$, $r = -0.18642$) and total lesion volume ($p = 0.6605$, $r = -0.06366$).

Pleocytosis (> 5 leucocytes/mm³) were present in twenty-two (40%) patients and high IgG index values (> 0.7) were observed in 38 (72%). Forty-five (83,3%) patients were OCB positive. There was a positive correlation between CSF leukocyte count and IgG index ($p = 0.046$, $r = 0.284$) (Fig. 5).

MS patients of this study were both followed up and evaluated after an average of 6.3 ± 2.7 years, ranging from 3 to 10 years, all of them have been treated with immunomodulators.

The correlation of IgG index with lesion total volume ($p=0.038$, $r=0.29$) and the total leukocytes count had remained significant ($p<0.001$, $r=0.479$) (fig. 6A, 6B). Pleocytosis were present in sixteen (30%) patients and high IgG index values were observed in 33 (61%). There had been also, an inverse correlation of the duration of disease with both the total leukocytes count ($p=0.0442$, $r=-0.275$) and brain volume ($p=0.02$, $r=-0.32$) (fig.7A, 7B).

The number of relapses was also inversely correlated to the brain volume ($p=0.026$, $r=-0.32$) (fig.8). The annual relapse rate decreased ($p<0.001$), although many patients had presented an increase at EDSS ($p<0.001$), which was more elevated in males.

There has been no decrease at the lesion load measured by TLV ($p=0.53$). EDSS evolution did not show correlation with TLV or with brain volume, but EDSS has correlated with the duration of disease ($p=0.05$, $r=0.48$) (fig.9).

Brain volume measures did not show significant differences through the analyzed period.

Due to the difference in the duration of disease among the patients, the analysis was redone, correcting all the differences, using the original data as the one with the correction by the time of the follow up. It was verified a significant difference in the score count increase for EDSS scale and score decrease for the annual relapse rate.

Discussion

We have performed an in vivo longitudinal analysis of RRMS patients, demonstrating the relevance of both intrathecal IgG synthesis and lesion load in the inflammatory process and brain atrophy in the remission phase of symptoms, before and after the treatment with immunomodulators.

In previous studies, we and others have demonstrated that RRMS patients with higher intrathecal IgG synthesis presented a greater brain lesion burden (26, 27,28,29,30). Although a significant correlation of IgG index and EDSS were not found, our results confirm the CSF sensibility in demonstrating the inflammatory process in CNS, with a positive correlation between intrathecal IgG index and pleocytosis, even when the patients were under treatment. Recent study provide evidence for the occurrence a important synaptic retraction of alpha motoneurons during the exacerbation phase of Experimental autoimmune encephalomyelitis, a experimental model of MS, induced in Lewis rats. This retraction is rapidly recovered during the remission phase of the disease, while the inflammatory process continues. These findings emphasize the different timing between both recover of synapse regeneration and inflammatory reactions in the demyelinating process (31).

In the present study, the inverse correlation of brain volume with number of relapses and with disease span suggest the impact of axonal damage in the course of disease, which is also corroborate to increase of EDSS. Since the annual relapse rate decreased after treatment, one can infer that the clinical worsening during the disease span was not related exclusively to the inflammatory process, but probably also to the neurodegenerative changes.

On the other hand, there was not also a strong relationship between motor impairment scores and MRI imaging changes, leading the authors to conclude that the EDSS scale has low sensitivity (32) and is not a good clinical parameter (tool) to measure brain injury. Possibly, a combination of features as white matter loss connections, associated with a possible impact of the plasticity (33) in determination of clinical disability, are crucial to generate MS motor symptoms.

Brain volume is a potentially promising biomarker of chronic tissue loss, which is axonal, neuronal and myelin (34). Although the reduction in brain parenchymal fraction (BPF) was greater in those patients with longer disease span, this atrophy did not get worse in the follow-up. This observation could indicate that the immunomodulators could have partial effect on delay of the degenerative process during the disease course or that this

process is slow, considering that demyelination and remyelination occur in different period during axonal injury, being necessary a long follow-up study to verify these differences.

Taken together, our data emphasize the importance of IgG intrathecal synthesis as a predictive value in brain lesion burden of RRMS patients, being a good marker of disease activity and a feasible tool for follow-up study of those patients who do not respond satisfactorily to current therapies. In addition, the efficacy of immunomodulators in this study in RRMS, reinforces the concept of early intervention, due to relapse reduction rate after treatment. Therefore, disease-modifying treatments for MS clearly have a beneficial effect in the inflammation.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from CNPq , FAPESP, and FAEP-UNICAMP. We gratefully thank patients and their relatives for their invaluable collaboration with the research.

References

- 1.Kurtzke JF, Page WF. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: VII Risk factors for MS. *Neurology* 1997; 48: 204-213.
2. Lassmann H: Pathology of multiple sclerosis; in Compston A, Ebers G, Lassmann H, McDonald I, Mathews B, Wekerle H (eds): *McAlpine's Multiple Sclerosis*. London, Churchill Livingstone, 1998, pp 323–358.
3. Prineas JW. The neuropathology of multiple sclerosis. In: Koetsier JC (ed) *Demyelinating Diseases*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985, pp 213-257.
4. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7:115-121.

5. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain* 1999;122:2279-2295.
6. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717.
7. Lucchinetti C, Brück W, Noseworthy J. Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment. *Curr Opin Neurol* 2000;14:259-269.
8. Guseo A, Jellinger K. The significance of perivascular infiltrations in multiple sclerosis. *J. Neurol.*1975; 211:51-60.
9. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998;338:278-85.
10. Comi G. Why treat early Multiple Sclerosis patient? *Curr Opin Neurolo* 2000 13:235-240.
11. Iannucci G, Tonorella C, Rovaris M, Sormani MP, Comi, G, Filippi M. The prognostic value of MR and MTI findings at presentation in patients with clinically isolated syndromes suggestive of MS. *Am J Neuroradiol* 2000; 21:1034-1038.
12. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R. Axonal transection in the lesions of Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 1999;338:278-285.
13. Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in Multiple Sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 1999;12:295-302.
14. Poser CM, Paty DW, Scheinberg LC, et al: New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol* 1983;13:227–231.

- 15 Kurtzke JF: Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: the extended disability status scale. *Neurology* 1983;33:1444–1452.
- 16 Link H, Tibbling G: Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:397–401.
- 17 Keir G, Luxton RW, Thompson EJ: Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990;27:436–443.
- 18 Rondina JM, Cendes F, Lotufo RA: Desenvolvimento de um sistema semi-automático para a segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética. *Anais CBIS – VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde*, 2002.
- 19 Beucher S, Meyer F: The morphological approach to segmentation: the watershed transform; in Dougherty ER (ed): *Mathematical Morphology in Image Processing*. New York, Marcel Dekker, 1993, chap 12, pp 433–481.
- 20 Lotufo RA, Falcão AX: The ordered queue and the optimality of the watershed approaches; in Goutsias J, Vincent L, Bloomeberg D (eds): *Mathematical Morphology and Its Application to Image and Signal Processing*. Dordrecht, Kluwer Academic, 2000, pp 341–350.
- 21 Beucher S, Lantuéjoul C: Use of watersheds in contour detection. *International Workshop on Image Processing, Real-Time Edge and Motion Detection/Estimation*, Rennes, 1979
- 22 Dougherty E, Lotufo R: *Hands-on Morphological Image Processing*. Bellingham, SPIE Press, 2003.
- 23 Meyer F, Beucher S: Morphological segmentation. *J Vis Commun Imag Processing* 1990;1: 21–46.
- 24 Audigier R, Lotufo RA, Falcão AX: 3D Visualization to Assist Iterative Object Definition from Medical Images. *Computerized Medical Imaging and Graphics*. ISSN 0895-6111, Elsevier, 2006.

25. Audigier R, Lotufo RA, Falcão AX: On integrating iterative segmentation by watershed with tridimensional visualization of MRIs. XVII Brazilian Symposium on Computer Graphics and Image Processing, Curitiba, Oct 2004. Curitiba, IEEE Press, 1530-1834, ISBN 1530-1834, ISBN 0-76952227-0, IEEE Press, pp 130–137.
26. Intrathecal Immunoglobulin G Synthesis and Brain Injury by Quantitative MRI in multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation* 2006;507:1-7.
27. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, et al: Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 1999;5:170–175.
28. Baumhefner RW, Tourtellotte WW, Syndulko K, et al: Quantitative multiple sclerosis plaque assessment with magnetic resonance imaging. *Arch Neurol* 1990;47:19–26.
29. Rudick R, Cookfair D, Simonian N, et al: Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFN β -1a) for relapsing multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;93: 8– 14.
30. Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M: Intrathecal IgG synthesis and autoantibody secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000;108: 207–215.
31. Marques KB, Santos LM, Oliveira AL. Spinal motoneuron synaptic plasticity during the course of an animal model of multiple sclerosis. *Eur J Neurosci* 2006;24: 3053-62.
32. Ge Y, Grossman RI, Udupa JK, Babb JS, Nyul LG, Kolson DL: Brain atrophy in relapsing remitting multiple sclerosis: fractional volumetric analysis of gray matter and white matter. *Radiology* 2001; 220: 606–610.
33. Filippi M, Rocca MA: Disturbed function and plasticity in multiple sclerosis as gleaned from functional magnetic resonance imaging. *Curr Opin Neurol* 2003; 16: 275–282.
34. Miller DH, Barkoff F, Frank JA, Parker GJM, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125:1676-1695.

Table 1. Summary of clinical and laboratory data

Parameter	MS before treatment	MS after treatment
Pacients	54	54
Females/ males	37: 17	37: 17
Age at onset , years		
Mean +-SD	30 (9.6)	30 (9.6)
Range	10- 46	10- 46
Duration of disease, years		
Mean +-SD	10 (5.8)	11 (5.7)
Range	1- 29	3- 31
Relapse rate / year		
Mean +-SD	1.4 (1.0)	0.4 (0.4)
Range	0.3- 6.0	0- 2.0
EDSS score		
Mean +-SD	2.6 (1.2)	4.3 (2.0)
Range	1- 6	1- 8
IgG index		
Mean +-SD	0.9 (0.4)	0.8 (0.3)
Range	0.3- 2.3	0.3- 2.4
Leukocytes		
Mean +-SD	6 (8.4)	4 (4.6)
Range	1- 46	1- 25
Plaques		
Mean +-SD	69 (46.4)	63 (43.9)
Range	0- 172	0- 173
Brain TLV,(cm3)		
Mean +-SD	13.9 (13.5)	15.4 (17.6)
Range	0-87.0	0-59.6
BPF volume, (cm3)		
Mean +-SD	952.5 (88.5)	947.6 (82.9)
Range	756.7- 1118.7	734.7- 1084.8

IgG index = (CSF IgG/ serum IgG)/(CSF Albumin/ serum Albumin).

BPF – brain parenchymal fraction , TLV- total lesion volume

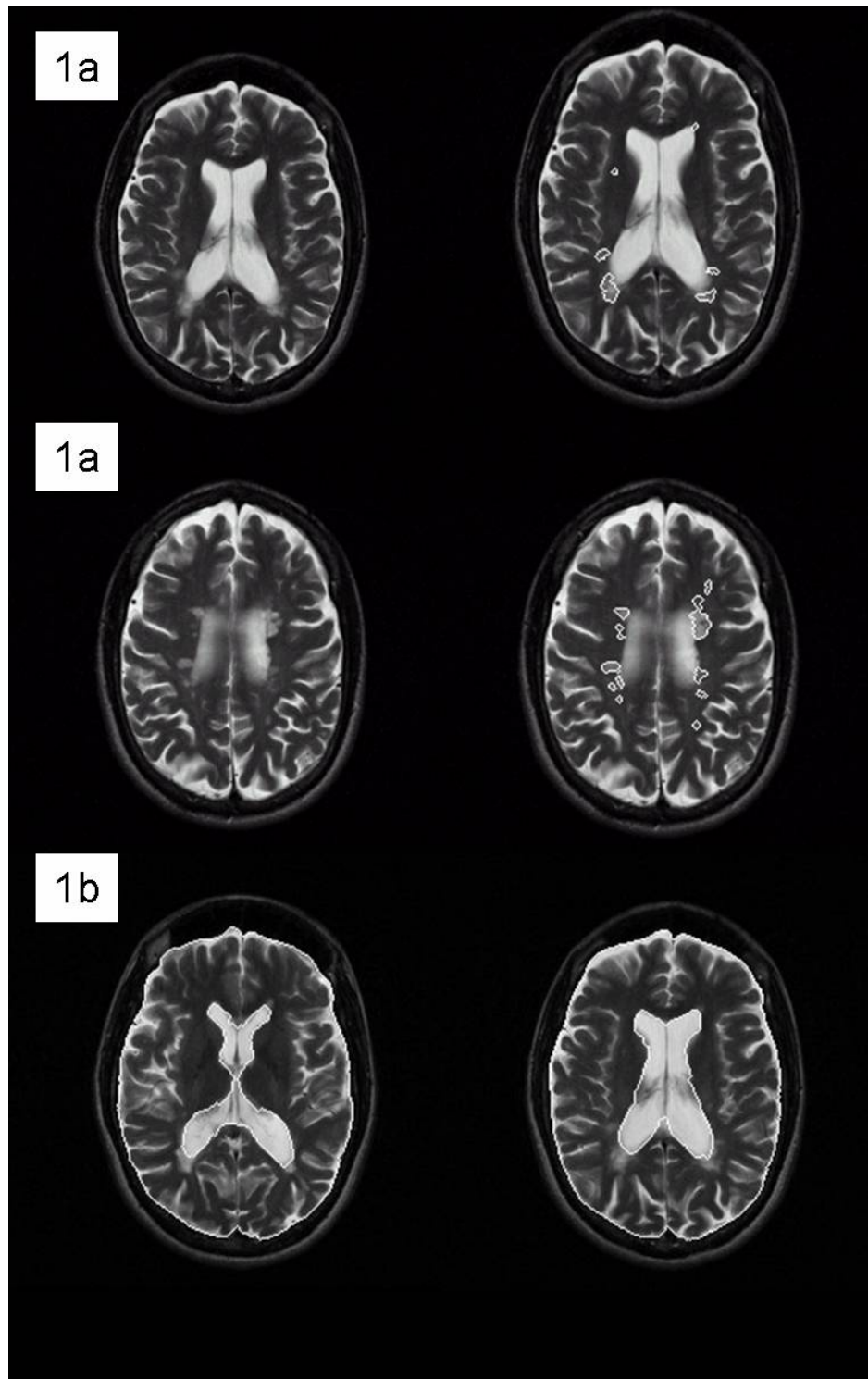


Figure 1- MRIs were obtained in a 2-tesla system in the transaxial plane, using semi-automatic threshold technique. In details, sequence of tracing the regions of interest to segment the lesions (1a) and the total brain parenchymal fraction (BPF) volume (1b) of a patient with RRMS.

ANEXO 5- Artigo submetido ao periódico Multiple Sclerosis Journal

Quantitative MRI and Tau proteins in multiple sclerosis patients

Brandão CO¹, Ruocco HH², Farias AS¹, Oliveira C¹, Cendes F², Damasceno BP², Santos LMB¹

From the Neuroimmunology- Unit 1- Department of Microbiology and Immunology 2- Department of Neurology- Medical School - University of Campinas - UNICAMP - Campinas – SP - Brazil

Running title: MRI and Tau proteins in MS patients

Key words: brain parenchymal fraction · cerebrospinal fluid · brain total lesion volume · intrathecal IgG synthesis · magnetic resonance imaging · t-tau · p-tau · multiple sclerosis · treatment

Address for correspondence:

Leonilda M. B. Santos Ph.D. – Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes – Instituto de Biologia- UNICAMP- Campinas – SP- Brazil- CEP 13083-970 – FAX # 55.19.35216276 Phone: 55.19.35216262.

E-mail: carlosotavio@neurolifelaboratorios.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating, and neurodegenerative disorder of the central nervous system with a highly variable clinical course.

OBJECTIVE: To investigate the relationship between tau proteins and brain atrophy, inflammatory CSF parameters and treatment in a sample of Brazilian MS patients.

METHODS: 41 patients with relapsing-remitting MS were included in this study according to revised McDonald criteria. MRIs were performed and CSF samples were collected both before and after immunomodulator treatment. IgG index was measured by nephelometry and oligoclonal bands were identified by isoelectrofocusing. Tau proteins were quantified using commercial kits by ELISA. Brain MRI examinations were performed using a semi-automated local lesion threshold technique. **RESULTS:** Increased CSF T-tau levels were found in MS patients in relation to controls and brain atrophy was observed since the diagnosis of disease. The level of T-tau protein was significantly reduced in treated MS patients. There was no correlation of CSF T-tau proteins with brain atrophy and inflammatory CSF parameters. **CONCLUSION:** These data suggest that axonal damage is influenced at least in part by inflammatory activity.

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the CNS, characterized by persistent intrathecal synthesis of immunoglobulins, axonal degeneration and recruitment of activated T cells and macrophages into the CNS [1, 2].

It has been shown that the presence of axonal damage is an important factor in the progression of the disease [3-6]. The axonal destruction and neuronal loss occur early during multiple sclerosis as a consequence of the inflammatory response [4, 7-9] and therefore early changes might occur in markers in the cerebrospinal fluid (CSF). Tau proteins are considered to be important for maintaining the stability of axonal microtubules involved in the mediation of fast axonal transport of synaptic constituents. Following neuronal damage, tau is released into extra cellular space and may be increased in the CSF [10].

Increased cerebrospinal fluid (CSF) tau concentrations in patients with MS were previously described and it has been suggested that this could be a marker of axonal damage [11-17]. However, the studies addressing this issue in MS present conflicting results [18-22].

Pathological and clinical features as well as the inflammatory aspects had been widely studied, but little is known about the disease's prognostic. Therefore, the search for biological markers of disease activity and the knowledge of prognostic factors, which can predict the clinical course of a more specific and effective therapy, is still necessary.

This study was designed to test the hypothesis that inflammation may be at least in part responsible for the axonal damage observed in MS patients [14, 23]. The CSF level of tau proteins from patients with relapsing-remitting MS (RRMS), before and after the treatment was determined. The potential relationship of T-tau and P-tau181 with cerebral atrophy was also investigated as well as the brain inflammation measures by MRI with inflammatory CSF parameters, such as the number of CSF leukocytes, intrathecal IgG and IgG oligoclonal bands.

Patients and Methods

Patients

MS patients and controls were recruited in sequential visits at our university hospital, from 2005 to 2008. This study was approved by the Ethics Committee of our institution, and informed consent was obtained for all patients. A total of 51 individuals (37 women and 14 men) were included in the study. At that time, the individuals were divided into three groups: I. 13 MS patients without treatment (3 men, 10 women, the mean age 34), all with the relapsing-remitting (RRMS) form of the disease, according to revised McDonald criteria [24]; II. 28 RRMS patients (8 men, 20 women, the mean age 30) using interferon β or glatiramer acetate for at least three years; III. 10 individuals (3 men, 7 women, the mean age 27) with headache and no evidence of original neurological disease, studied as a healthy control group.

Twenty healthy volunteers (9 men and 11 women), with ages ranging from 20 to 62 years (mean age of 32 years) were studied as a control group for MRI. The normal control group was used only to compare the brain atrophy component. They were recruited from the local community and had no family history of neurological or psychiatric illness.

The acquisition images through MRI were performed in two different times: (1) during the disease investigation, before the beginning of any immunomodulator or immunosuppressive treatment; (2) after the treatment with immunomodulators (beta interferon and glatiramer acetate) for at least three years.

Serum and CSF samples

CSF and serum samples were obtained by lumbar puncture and peripheral vein puncture, respectively. CSF samples were immediately analyzed for CSF cell population within 30 minutes after lumbar puncture and cell-free supernatants were stored in polypropylene tubes at -80°C .

Laboratory procedures

IgG and albumin in the CSF and serum were measured by nephelometry (BNII; Dade Behring, Marburg, Germany). IgG indexes were calculated according to the literature [25] and oligoclonal IgG bands (OCB) were identified by isoelectrofocusing [26].

CSF samples were analyzed for P-tau181 and T-tau using a commercial enzyme-linked assay (ELISA INNOTEST P-tau-181 and INNOTEST htau-Ag-kits) (Innogenetics, Gent, Belgium) [27].

Imaging

MRI examinations were performed using a 2.0-tesla system (Elscent, Prestige, Haifa, Israel). All exams have covered the whole brain and sections were made in the coronal, sagittal and axial planes. MRI acquisition parameters for images used for analysis include: (1) T 1 sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, repetition time (TR) 550 ms, echo time (TE) 12 ms, matrix 270 x 200; (2) T 1 axial images, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 300 x 210; (3) T 2 sagittal images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 6,600 ms, TE 128 ms, matrix 320 x 252; (4) axial double echo images, proton density weighted, 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 16 ms, matrix 256 x 256; T 2 , 6 mm thick, flip angle = 1,700, TR 4,800 ms, TE 128 ms, matrix 256 x 256; inversion time 2,550 ms; (5) axial flair images, 6 mm thick, flip angle = 1,100, TR 10,099 ms, TE 90 ms, matrix 250 x 250; (6) coronal T1, 6 mm thick, flip angle = 1,800, TR 550 ms, TE 12 ms, matrix 270 x 200. (7) axial T1 gradient echo, 3mm thick (flip angle, 70°; TR, 200; TE, 5; matrix, 180x232; FOV, 22x22 cm); (8) axial T2 fast spin-echo, 4mm thick (flip angle, 120°; TR, 6800; TE, 129; matrix, 252x328; FOV, 21x23 cm) (9) volumetric (3-dimensional) T1 gradient echo, acquired in the sagittal plane for multiplanar reconstruction, 1 mm thick (tip angle, 35°, TR, 22; TE, 9; matrix, 256x220; FOV, 23x25 cm). Administration of 0.1 mmol/kg of gadolinium- DTPA was used.

Brain MRI data were quantified using a semi-automated local lesion threshold technique. A semi-automated segmentation was performed using the software NeuroLine (interactive system for neuroimaging segmentation and analysis), developed in our neuroimaging laboratory [28, 29].

Measurements of cerebral hemisphere volumes were performed using volumetric (3-dimensional) T1 gradient echo. The total brain parenchymal fraction (BPF) volume was quantified using a semi automated cerebral hemisphere threshold technique, through markers, using the same technique for brain lesion volume analysis described previously. Values < 2 standard deviations from the mean of the control group were considered abnormal.

Lesions were identified and measured by one of the authors (H.H.R.) who was blinded to laboratory and clinical results (fig. 1).

Statistical methods

Statistical significance of the results was determined using a non-parametric variance analysis, Kruskal-Wallis test and Spearman Rank test. A p value of < 0.05 was accepted as statistically significant. Statistical analyses were performed using the SAS System for Windows (Statistical Analysis System) 8.02., SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.

Results

The results are summarized in Table 1, Table 2 and plotted in Fig. 2.

The mean CSF concentrations of T-tau protein were significantly higher in the MS patient group when compared with normal controls ($p < 0.01$) and treated MS ($p < 0.05$) (256.62 ± 74.54 , 174.00 ± 79.17 and 218.89 ± 8.95 pg/ml, respectively). No correlations were found between CSF tau protein concentrations and age, age at onset, and duration of the disease.

The CSF P-tau concentrations in the MS patient group did not differ from those of normal controls and treated MS (35.52 ± 11.52 , 38.32 ± 19.37 , 30.72 ± 9.22 pg/ml, respectively). No correlations were found between CSF P-tau and age.

There was no significant correlation in MS patients of CSF tau proteins (T-tau and P-tau) with brain atrophy and brain inflammation measures by MRI and inflammatory CSF parameters.

Measurement of brain parenchymal fraction (BPF) volume of MS patients was significantly lower than in healthy controls (mean $\pm$ SD BPF volume, 928.18 ± 93.88 and 1115.2 ± 131.32 , respectively; $p < 0.001$), but did not show significant differences through the analyzed period.

Discussion

There has been an increased search for markers related to MS activity and axonal damage. Some authors have concluded that CSF tau levels should be a marker of axonal impairment in patients with early relapsing-remitting MS [11, 16, 23, 30]. The clinical value of this biomarker in the early stages and active MS was previously described [12, 13, 15, 17]. Otherwise, brain volume is a potentially promising biomarker of chronic tissue loss, which is axonal, neuronal and myelin [31].

Our study has been designed to compare CSF tau levels of relapsing-remitting MS, before and after immunomodulator treatment, with brain measures by MRI and inflammatory CSF parameters. Firstly, in untreated MS patients, elevated levels of total tau were found in the CSF, indicating axonal impairment. Amongst the treated MS patients, it was observed a decreased whole cerebral volume, whereas we noticed no significant associations between T-tau levels and brain atrophy. Although the reduction in brain parenchymal fraction (BPF) was greater in those patients with longer disease span, this atrophy did not get worse in the follow-up.

In previous studies, we and others have demonstrated that RRMS patients with higher intrathecal IgG synthesis presented a greater brain lesion burden [32-36]. In the current study, there has not been significant correlation in MS patients of CSF tau proteins

(T-tau and P-tau) with brain inflammation measures by MRI and inflammatory CSF parameters. In accordance with others studies, these findings do not confirm CSF tau as a sensitive marker of MS activity [19-22]. However, our results reveal that treatment with immunomodulator decrease CSF tau proteins and support the hypothesis that axonal damage is influenced at least in part by inflammatory activity.

In conclusion, the brain measures by MRI and CSF tau levels provide complementary information about the picture of MS patients.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support from CNPq , FAPESP, and FAEP-UNICAMP. We gratefully thank patients and their relatives for their invaluable collaboration with the research.

References

- [1] Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. Mult Scler. 1998;4:93-8.
- [2] Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR. Continual breakdown and regeneration of myelin in progressive multiple sclerosis plaques. Ann N Y Acad Sci. 1984;436:11-32.
- [3] Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. Brain. 1997;120:393-9.
- [4] Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med. 1998;338:278-85.
- [5] Scolding N, Franklin R. Axon loss in multiple sclerosis. Lancet. 1998;352:340-1.

- [6] Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K, Palkovits M, Komoly S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain*. 2000;123:308-17.
- [7] Comi G. Why treat early multiple sclerosis patients? *Curr Opin Neurol*. 2000;13:235-40.
- [8] Iannucci G, Tortorella C, Rovaris M, Sormani MP, Comi G, Filippi M. Prognostic value of MR and magnetization transfer imaging findings in patients with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis at presentation. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000;21:1034-8.
- [9] Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol*. 1999;12:295-302.
- [10] Delacourte A. Pathological Tau proteins of Alzheimer's disease as a biochemical marker of neurofibrillary degeneration. *Biomed Pharmacother*. 1994;48:287-95.
- [11] Terzi M, Birinci A, Cetinkaya E, Onar MK. Cerebrospinal fluid total tau protein levels in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2007;115:325-30.
- [12] Bartosik-Psujek H, Stelmasiak Z. The CSF levels of total-tau and phosphotau in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neural Transm*. 2006;113:339-45.
- [13] Brettschneider J, Petzold A, Junker A, Tumani H. Axonal damage markers in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome improve predicting conversion to definite multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2006;12:143-8.
- [14] Brettschneider J, Maier M, Arda S, Claus A, Süssmuth SD, Kassubek J et al. Tau protein level in cerebrospinal fluid is increased in patients with early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2005;11:261-5.
- [15] Rostasy K, Withut E, Pohl D, Lange P, Ciesielcyk B, Diem R et al. Tau, phospho-tau, and S-100B in the cerebrospinal fluid of children with multiple sclerosis. *J Child Neurol*. 2005;20:822-5.

[16] Martínez-Yélamos A, Saiz A, Bas J, Hernandez JJ, Graus F, Arbizu T. Tau protein in cerebrospinal fluid: a possible marker of poor outcome in patients with early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2004;363:14-7.

[17] Süssmuth SD, Reiber H, Tumani H. Tau protein in cerebrospinal fluid (CSF): a blood-CSF barrier related evaluation in patients with various neurological diseases. *Neurosci Lett*. 2001;300:95-8.

[18] Teunissen CE, Iacobaeus E, Khademi M, Brundin L, Norgren N, Koel-Simmelink MJ et al. Combination of CSF N-acetylaspartate and neurofilaments in multiple sclerosis. *Neurology*. 2009;72:1322-9.

[19] Valis M, Talab R, Stourac P, Andrys C, Masopust J. Tau protein, phosphorylated tau protein and beta-amyloid42 in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008;29:971-6.

[20] Hein Née Maier K, Köhler A, Diem R, Sättler MB, Demmer I, Lange P et al.

Biological markers for axonal degeneration in CSF and blood of patients with the first event indicative for multiple sclerosis. *Neurosci Lett*. 2008;436:72-6.

[21] Guimarães I, Cardoso MI, Sá MJ. Tau protein seems not to be a useful routine clinical marker of axonal damage in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2006;12:354-6.

[22] Jiménez-Jiménez FJ, Zurdo JM, Hernanz A, Medina-Acebrón S, de Bustos F, Barcenilla B et al. Tau protein concentrations in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2002;106:351-4.

[23] Bartosik-Psujek H, Archelos JJ. Tau protein and 14-3-3 are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and correlate with intrathecal synthesis of IgG. *J Neurol*. 2004;251:414-20.

[24] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58:840-6.

- [25] Link H, Tibbbling G: Principles of albumin and IgG analysis in neurological disorders: III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:397-401.
- [26] Keir G, Luxton RW, Thompson EJ: Isoelectric focusing cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Ann Clin Biochem* 1990;27:436-43.
- [27] Andreassen N, Minthon L, Clarberg A, Davidsson P, Gottfries J, Vanmechelen E et al. Sensitivity, specificity, and stability of CSF-tau in AD in a community-based patient sample. *Neurology*. 1999;53:1488-94.
- [28] Rondina JM, Cendes F, Lotufo RA: Desenvolvimento de um sistema semi-automático para a segmentação de estruturas cerebrais em imagens de ressonância magnética. *Anais CBIS' – VIII Congresso Brasileiro de Informática em Saúde*. Natal, 2002, 29/09 a 02/10.
- [29] Beucher S, Meyer F (1993): The morphological approach to segmentation: the watershed transform; in Dougherty ER (ed): *Mathematical morphology in image processing*. New York, Marcel Dekker, 1993, chapter 12, pp. 433-481.
- [30] Kapaki E, Paraskevas GP, Michalopoulou M, Kilidireas K. Increased cerebrospinal fluid tau protein in multiple sclerosis. *Eur Neurol*. 2000;43:228-32.
- [31] Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*. 2002 Aug;125(Pt 8):1676-95.
- [32] Brandão CO, Ruocco HH, Farias AS, Oliveira C, Cendes F, Damasceno BP, Santos LM. Intrathecal immunoglobulin G synthesis and brain injury by quantitative MRI in multiple sclerosis. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13:89-95.
- [33] Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999;5:170-5.

- [34] Baumhefner RW, Tourtellotte WW, Syndulko K, Waluch V, Ellison GW, Meyers LW et al. Quantitative multiple sclerosis plaque assessment with magnetic resonance imaging. Its correlation with clinical parameters, evoked potentials, and intra-blood-brain barrier IgG synthesis. *Arch Neurol.* 1990;47:19-26.
- [35] Rudick RA, Cookfair DL, Simonian NA, Ransohoff RM, Richert JR, Jacobs LD et al. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNbeta-1a) for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *J Neuroimmunol.* 1999;93:8-14.
- [36] Sellebjerg F, Jensen CV, Christiansen M. Intrathecal IgG synthesis and autoantibody-secreting cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2000;108:207-15.

Table 1. Summary of MRI data

Parameter	MS before treatment	MS after treatment
Plaques		
Mean +-SD	69 (46.4)	63 (43.9)
Range	0- 172	0- 173
Brain TLV,(cm3)		
Mean +-SD	13.9 (13.5)	15.4 (17.6)
Range	0-87.0	0-59.6
BPF volume, (cm3)		
Mean +-SD	952.5 (88.5)	947.6 (82.9)
Range	756.7- 1118.7	734.7- 1084.8
BPF – brain parenchymal fraction volume, TLV- total lesion volume, MRI – magnetic resonance imaging		

Table 2. Summary of clinical and laboratory data.

Parameter	MS untreated	MS treated
Pacients	13	28
Females/ males	10: 03	20: 08
Age at onset , years		
Mean +-SD	34 (7.9)	30 (9.8)
Range	16- 44	10- 46
Duration of disease, years		
Mean +-SD	10 (5.8)	11 (5.7)
Range	1- 29	3- 31
EDSS score		
Mean +-SD	2.6 (1.2)	4.3 (2.0)
Range	1- 6	1- 8
IgG index		
Mean +-SD	0.88 (0.48)	0.86 (0.32)
Range	0.38- 2.21	0.44- 1.49
CSF Leukocytes		
Mean +-SD	5 (4.2)	5 (4.3)
Range	1- 13	1- 17
IgG index = (CSF IgG/ serum IgG)/(CSF Albumin/ serum Albumin)		

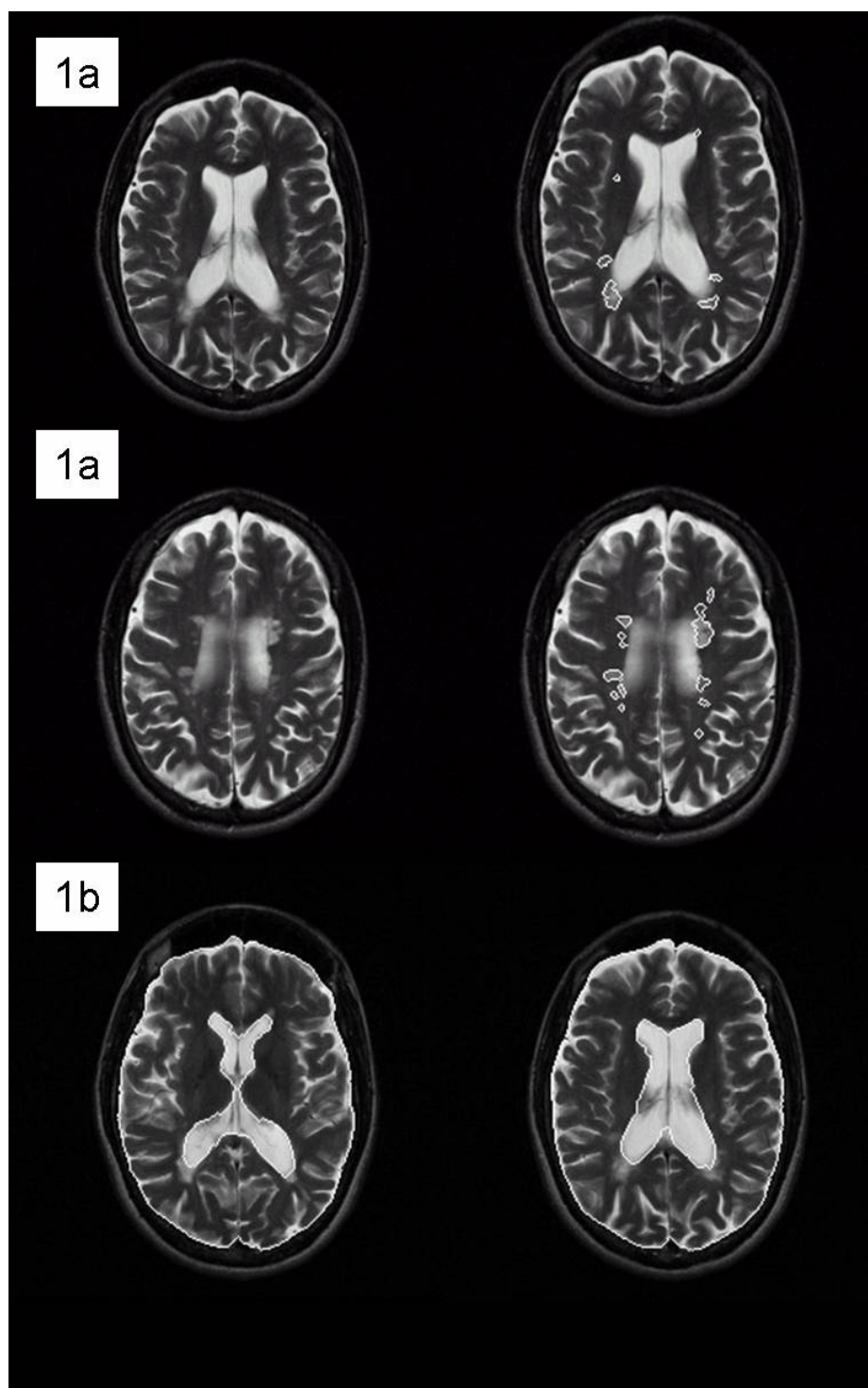


Figure 1. MRIs were obtained in a 2-tesla system in the transaxial plane, using semi-automatic threshold technique. In details, sequence of tracing the regions of interest to segment the lesions (1a) and the total brain parenchymal fraction (BPF) volume (1b) of a patient with RRMS.

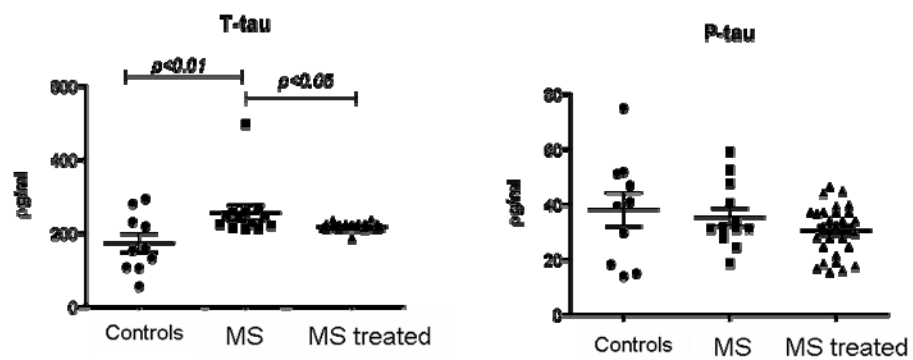


Figure 2. Cerebrospinal fluid levels of t-tau and p-tau proteins in RRMS patients, RRMS patients treated and normal controls.

ANEXO 6- Termo de consentimento esclarecido para realização da punção lombar

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PUNÇÃO LOMBAR)

(Conforme resolução 196/96)

Projeto: Estudo dos Mediadores de Inflamação no Líquido Cefalorraqueano de pacientes portadores de Esclerose Múltipla.

Responsável: Leonilda M. B. Santos

Justificativa e Objetivos: A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença que acomete o homem, normalmente adultos jovens. A incidência de tal doença em nosso meio vem aumentando, causando preocupação nos especialistas. Aceita-se atualmente que as lesões causadas pela Esclerose Múltipla seja resultado de uma reação que o organismo faz para se defender contra ele mesmo. Normalmente o tratamento mais utilizado pode causar uma série de efeitos colaterais. Diante disto, a imunoterapia com IFNB está sendo empregada na tentativa de diminuir os danos das reações auto-imunes. Neste trabalho, propomos acompanhar os pacientes da UNICAMP que são tratados e não tratados com IFNB estudando a destruição das células que causam a doença e algumas moléculas que são responsáveis pelo movimento das células no líquido dos pacientes.

Os pacientes serão estudados antes e durante o tratamento com o IFNB, sendo este estudo realizado em um período de 3 anos onde pretendemos realizar pelo menos duas punções lombares para análise do líquido.

Procedimentos: O paciente deverá, em data pré determinada, se encaminhar ao centro de neurologia da UNICAMP / HC para a retirada de 10 cc do líquido (obtida pela punção lombar) e 10cc do sangue para os estudos. Não é necessário estar em jejum e nem interromper medicações utilizadas.

Risco e Desconforto: A coleta do líquido será realizada nas costas (região lombar). A dor que acompanha a punção lombar é semelhante aquela da coleta de sangue. O desconforto será mínimo, pois será realizada com anestesia local por profissional treinado e devidamente habilitado para a realização de punção lombar. Após submeter-se a punção lombar, o paciente deverá permanecer em repouso absoluto em casa , por 48 horas, e aumentar a ingestão de líquidos. Este repouso é importante para evitar cefaléia (dor de cabeça) após a punção, impossibilitando a realização das atividades habituais. Se houver dor de cabeça, mesmo com o repouso de 48 horas, o paciente deverá permanecer em repouso por mais alguns dias. Este tipo de dor de cabeça não traz qualquer prejuízo ao paciente, mas necessita de repouso para desaparecer. O médico orientará o repouso e qualquer dúvida que possa ocorrer.

A coleta do líquido por utilizar agulha apresenta os riscos inerentes ao procedimento. São descritas, raramente, intercorrências da punção, como dormências transitórias, dor local e infecção. Entretanto, a incidência destas complicações é baixa. O material é descartável e as agulhas atuais (modelo 22Gx 3.5 = 70x7) são mais finas e de excelente qualidade. Caso ocorra qualquer desconforto após o procedimento, o paciente deverá contactar a equipe de atendimento do HC - UNICAMP e a equipe de pesquisa, que orientarão as medidas a serem tomadas para aliviar os sintomas, sem nenhum custo .

Benefícios: Acompanhamento ao paciente para verificar se ele está sendo beneficiado com a Imunoterapia (tratamento com Interferon Beta).

Esclarecimento: Todas as dúvidas e perguntas do paciente quanto a assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento serão esclarecidas pelos pesquisadores.

Recusa ou Descontinuação da participação: Durante o decorrer do estudo informaremos ao paciente o andamento da pesquisa, podendo este deixar de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo no atendimento que recebe pelo HC – UNICAMP, caso decida não colaborar com a equipe. A participação do paciente é voluntária.

Sigilo: As informações recebidas durante e depois do tratamento e a privacidade do paciente serão mantidas em sigilo. Se os resultados forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado. Caso tenha alguma dúvida deverá procurar a Dra Leonilda no telefone (0xx19) 7887911 ramal 221.

Gastos adicionais: Se houverem gastos adicionais (seringas, agulhas descartáveis, ...) estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Eu confirmo que Carlos Otávio Brandão explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido, os riscos, desconforto e possíveis vantagens advindas desse projeto de pesquisa. Eu li, e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Paciente: _____

Idade:

RG:

Endereço:

Assinatura : _____

Responsável pelo paciente: _____

Idade:

RG:

ANEXO 7- Termo de consentimento esclarecido para realização da ressonância magnética

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (RESSONÂNCIA MAGNÉTICA)

(Conforme resolução 196/96)

Projeto: Estudo dos Mediadores de Inflamação no Líquido Cefalorraqueano e Ressonância Magnética Quantitativa em pacientes portadores de Esclerose Múltipla.

Responsável: Leonilda M. B. Santos

TERMO PARA PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Justificativa e Objetivos: A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença que acomete o homem, normalmente adultos jovens. A incidência de tal doença em nosso meio vem aumentando, causando preocupação nos especialistas. Aceita-se atualmente que as lesões causadas pela Esclerose Múltipla seja resultado de uma reação que o organismo faz para se defender contra ele mesmo. Normalmente o tratamento mais utilizado pode causar uma série de efeitos colaterais. Diante disto, a imunoterapia com IFNB está sendo empregada na tentativa de diminuir os danos das reações auto-imunes. Neste trabalho, propomos acompanhar os pacientes da UNICAMP que são tratados e não tratados com IFNB. O objetivo geral é estudar as células que causam a doença, identificar e quantificar as alterações estruturais do sistema nervoso pela ressonância magnética.

A ressonância magnética é uma técnica capaz de produzir imagens de alta qualidade e sem a exposição aos raios X.

Procedimento:

Eu entendo que se concordar em participar deste estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e de minha família. Eu serei submetido a um exame físico neurológico para estabelecer meu estado clínico.

O procedimento de ressonância magnética é semelhante a uma tomografia. Eu fui informado que serei colocado em uma maca e movido lentamente para dentro de um aparelho de ressonância magnética. Um alto falante dentro do campo magnético possibilita a minha constante comunicação com as pessoas responsáveis pelo exame. Durante todo o tempo, o pessoal médico e paramédico pode me ver e ouvir, e posso ser removido(a) se for preciso. O procedimento pode durar entre 45 a 90 minutos. Durante a primeira parte do exame, eu irei ouvir ruídos tipo marteladas por alguns minutos enquanto o aparelho faz as imagens do meu cérebro. O restante do exame será relativamente silencioso.

Risco e Desconforto: O único desconforto relacionado a este exame é o ruído intermitente durante os primeiros 15 minutos. Depois disso o ruído será muito menor. O pessoal técnico providenciará tapa-ouvidos para me deixar mais confortável. Não existem efeitos nocivos associados com a ressonância magnética dentro das condições utilizadas atualmente.

Benefícios: Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que o meu diagnóstico e tratamento provavelmente não serão modificados. Contudo os resultados deste estudo podem, no longo prazo, oferecer vantagens para os indivíduos com esclerose múltipla, possibilitando um melhor diagnóstico e um tratamento mais adequado. Os resultados do meu exame de ressonância magnética ficarão a disposição dos médicos responsáveis pelo meu tratamento, e poderão ser úteis no futuro.

REQUERIMENTOS

É muito importante informar aos médicos (as) e técnicos (as) caso eu tenha um marca-passos cardíaco, um clipe de cirurgia para aneurisma cerebral ou qualquer outro objeto metálico em meu corpo, que tenha sido implantado durante uma cirurgia ou alojado em meu corpo durante um acidente, pois estes podem parar de funcionar ou causar acidentes devido ao forte campo magnético que funciona como um ímã muito forte. Eu também devo remover todos os objetos metálicos que estiverem comigo (relógio, canetas, brincos, colares, anéis etc), pois estes também podem se movimentar ou aquecer dentro do campo magnético.

ESCLARECIMENTO

Todas as dúvidas e perguntas do paciente quanto a assuntos relacionados com a pesquisa serão esclarecidas pelos pesquisadores.

SIGILO E INFORMAÇÕES ADICIONAIS

As informações recebidas durante os testes e a privacidade do paciente serão mantidas em sigilo. Caso tenha alguma dúvida deverá procurar o Dr. Carlos Otávio Brandão no telefone (21) 25574731 ou Dr. Fernando Cendes (19) 788-8217. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contactar a secretaria da Comissão de Ética da Faculdade de Ciência Médicas-Unicamp, tel. (19) 7887232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-Unicamp.

Solicito o consentimento informado do paciente abaixo identificado para realização do exame de ressonância magnética de crânio, com fins de pesquisa, sem qualquer ônus para o paciente.

Sua identidade será conhecida somente pelos investigadores que trabalham no estudo. Publicações de resultados provenientes deste estudo não serão identificadas pelo nome. O paciente será bem vindo a conhecer as publicações resultantes desta pesquisa.

Nós solicitamos ao (a) senhor (a) que antes de assinar este consentimento peça esclarecimentos sobre quaisquer dúvidas a respeito do estudo.

Eu confirmo que Carlos Otávio Brandão explicou-me o objetivo do estudo e os procedimentos . Eu li, e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Paciente: _____

Idade:

RG:

Endereço:

Assinatura : _____

Responsável pelo paciente: _____

Idade:

RG:

Endereço:

Grau de parentesco (xerox documento de identidade):

Assinatura:

Responsabilidade do pesquisador. Eu expliquei a _____
o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos e vantagens que
poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a
fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Carlos Otávio Brandão

RG 9217298 SSP/SP

CRM: 5253534 – 3

Data: _____

Membros da Equipe:

Carlos Otávio Brandão

Tel: (0xx21) 25574731

Qualquer intercorrência médica, ligar para qualquer um dos membros da equipe.

ANEXO 8- Aprovação do Comitê de Ética



CEP: 09/0001
(Grupo III)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Caixa Postal 6121
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 19 7884936
fax 0 19 7884925

PARECER PROJETO: Nº 309/2000

IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DOS MEDIADORES DE INFLAMAÇÃO NO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO DE PACIENTES PORTADORES DE ESCLEROSE MÚLTIPLA"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Otávio Brandão

INSTITUIÇÃO: Ambulatório de Neurologia/HQ/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/10/2000

II - OBJETIVOS

O objetivo principal da pesquisa é quantificar marcadores da resposta inflamatória em diversos estados da doença e verificar se existe uma correlação entre os dados laboratoriais e a atividade clínica da doença.

III - SUMÁRIO

Trata-se de estudo clínico prospectivo com o objetivo de estudar os marcadores de inflamação no líquido cefalorraqueano (LCR) de pacientes portadores de esclerose múltipla. Os pesquisadores pretendem avaliar 20 pacientes em cada grupo e avaliar os parâmetros inflamatórios no LCR e sangue durante os fases pré, início da doença, tratamento com interferon e grupo controle.

O estudo será realizado em pacientes da Ambulatório de Neurologia do HQ/UNICAMP e que tenham o diagnóstico clínico de Esclerose Múltipla de acordo com critérios internacionais. Os estudos laboratoriais serão realizados no laboratório de Neuroimunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia do B-UNICAMP. A metodologia utilizada para a determinação dos parâmetros laboratoriais será: determinação dos níveis de TNF α , Interferon gama, IL 10, TGF β pelo método de ELISA e o estudo de moléculas de adesão e ativação celular: ICAM, VCAM, selectinas E e L pelo método de ELISA de captura.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Os autores justificam a realização do presente projeto com o estudo das correlações entre atividade inflamatória no LCR e sangue dos pacientes pode auxiliar no melhor tratamento e até tratamento preventivo de crise de ativação da doença.

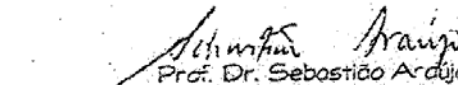
Na opinião dos relatores o projeto está adequado na sua revisão da literatura, justificativo, cosuística, metodologia e formulário de consentimento livre e esclarecido para os pacientes.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP, em 09 de Janeiro de 2001.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

9- APÊNDICES



APÊNDICE 1- Dados clínicos e parâmetros do LCR

P	Sexo	Idade	DD	Ns.	EDSS1	EDSS2	Ts	R1	R2	EBV	T- tau	P- Tau
1	M	34	16	4	3	6	6	0,6	0,3	positivo	NA	NA
2	F	21	3	2	1	1	3	2	0	positivo	NA	NA
3	M	37	3	6	3	6,5	3	2	2	positivo	NA	NA
4	M	32	5	4	2,5	6	4	2	0	negativo	187	18,7
5	F	25	9	5	1	1	6	2	0,4	positivo	225	17,8
6	F	11	31	4	3	3,5	6	1	0	negativo	214	16,3
7	M	27	5	7	2	6,5	4	2	1	negativo	NA	NA
8	F	31	5	5	2	2,5	4	1	0,6	negativo	NA	NA
9	M	34	13	10	2,5	7	4	1	0,3	positivo	NA	NA
10	F	14	23	15	1	2,5	8	0,6	0	negativo	216	19,3
11	M	35	13	4	3	4,5	9	1	0	positivo	214	17,1
12	F	29	13	11	5	8	8	1	0,5	positivo	221	28,3
13	M	28	19	4	4	6,5	9	1	0	positivo	NA	NA
14	F	18	14	9	4	8	8	1	0,5	negativo	NA	NA
15	F	25	9	6	1,5	2,5	5	2	0,5	negativo	NA	NA
16	F	17	9	5	1	2,5	8	1	0,1	negativo	NA	NA
17	M	43	11	5	2	6,5	5	1	0,2	positivo	NA	NA
18	F	19	8	9	3	4,5	5	5	0,5	negativo	219	34,3
19	F	30	5	4	2	2	5	1	0,5	positivo	215	37,4
20	F	19	17	8	4	7,5	8	1	0,5	positivo	NA	NA
21	F	24	9	7	3,5	6,5	7	4	0,1	negativo	212	34,3
22	M	40	11	5	3	3,5	5	0,5	0	negativo	225	37,4
23	F	33	13	9	2,5	3,5	8	1	0,5	negativo	218	24,9
24	F	35	14	3	4	6	8	1	0,3	negativo	217	28,1
25	F	16	9	5	2	2,5	7	1	0,4	negativo	215	37,4
26	M	24	3	9	3	4,5	3	6	1,5	negativo	NA	NA
27	M	46	7	3	4	6	5	1	0,25	positivo	224	28,1

DD= duração da doença; Ns= número de surtos; Ts= tempo de seguimento; R1= taxa anual de surtos no ponto 1;

R2= taxa anual de surtos no ponto 2; EBV= presença de anticorpos Epstein-Barr Virus no LCR;

EDSS= escore EDSS; T-tau= tau total; P-tau= tau fosforilada; NA= não avaliado.

APÊNDICE 2- Dados clínicos e parâmetros do LCR

P	Sexo	Idade	DD	Ns.	EDSS1	EDSS2	Ts	R1	R2	EBV	T- tau	P- Tau
28	F	31	10	8	1	1,5	8	2	0,42	0	216	39,9
29	F	35	12	5	4,5	6	8	1	0,14	0	NR	NR
30	F	44	13	4	3	3,5	5	0,5	0,6	1	NR	NR
31	F	43	14	6	1,5	2,5	5	2	0	0	225	34,3
32	F	41	14	4	1	2,5	8	1	0	0	224	45
33	F	33	16	9	3,5	4,5	8	2	0,8	0	NR	NR
34	F	16	15	11	2	3,5	9	1	0,2	0	NR	NR
35	F	33	7	4	2	3,5	7	1	0,2	0	225	37
36	F	29	13	4	1	2	3	1	N	1	216	24,9
37	F	39	9	6	2	2,5	8	1	0,3	1	NR	NR
38	M	43	10	2	6	6	4	2	0	0	NR	NR
39	M	28	22	5	4	8	9	0,5	N	0	NR	NR
40	M	29	9	6	3	3	8	2	0,1	0	214	37,4
41	F	38	26	5	3	6	7	1	0	0	236	29,8
42	F	17	13	9	4	4,5	9	1	0,5	0	NR	NR
43	M	13	5	9	2	5	5	3	1,25	0	238	46,7
44	M	36	8	6	2,5	3,5	7	0,5	N	0	215	15,6
45	M	21	9	3	1	2	7	0,3	N	1	217	39,5
46	F	37	3	6	2	3,5	3	3	1,5	1	NR	NR
47	F	23	13	7	1,5	2	4	1	0	1	NR	NR
48	F	29	11	8	5	8	10	1	0,5	1	217	32,1
49	F	28	15	12	3	6	9	1	0,7	1	NR	NR
50	F	42	8	3	1,5	2	7	2	0,2	0	227	44,2
51	F	43	18	7	2	4	6	2	0,4	0	216	21,8
52	F	27	16	11	3	4	8	2	1	0	NR	NR
53	F	39	8	5	1	2	3	1	0,5	1	NR	NR
54	F	40	6	4	2,5	3	4	1	0,7	0	221	32,6

DD= duração da doença; Ns= número de surtos; Ts= tempo de seguimento; R1= taxa anual de surtos no ponto 1;

R2= taxa anual de surtos no ponto 2; EBV= presença de anticorpos Epstein-Barr Vírus no LCR;

EDSS= escore EDSS; T-tau= tau total; P-tau= tau fosforilada; NA= não avaliado.

APÊNDICE 3- Parâmetros do LCR e captação de gadolínio na IRM

P	OB1	OB2	Q IgG1	Q Alb1	I. IgG1	Cel1	QIgG2	QAlb2	I.IgG2	Cel2	IgML2	IgMs2	QIgM2	I.IgM2	R IgM +	Gd +
1	1	1	7,10	3,81	1,86	2,00	3,75	3,83	0,97	2	0,08	121	0,66116	0,1726	0	0
2	1	0	1,70	2,60	0,65	8,00	1,78	3,23	0,96	6	0,02	174	0,11494	0,0356	0	0
3	1	1	4,85	5,56	0,87	8,00	5,92	6,13	0,96	6	0,06	76	0,78947	0,1288	0	1
4	0	0	2,67	5,23	0,51	15,00	2,71	5,65	0,48	5	0,05	91,1	0,54885	0,0971	0	0
5	1	1	2,14	2,70	0,79	9,00	2,59	2,93	0,88	2	0,08	110	0,72727	0,2482	1	1
6	1	1	5,28	7,21	0,78	1,00	6,9	6,32	1,09	1	0,07	183	0,38251	0,0605	0	0
7	1	1	2,86	2,82	1,01	2,00	3,94	3,16	1,24	4	0,4	139	2,8777	0,9107	1	1
8	1	1	2,09	2,54	0,82	3,00	2,12	2,44	0,86	3	0,01	91,1	0,10977	0,045	0	0
9	0	0	3,42	6,22	0,54	1,00	3,05	6,56	0,46	1	0,04	158	0,25316	0,0386	0	0
10	1	1	2,50	2,00	1,40	12,00	3,04	2,19	1,36	3	0,06	158	0,37975	0,1734	1	0
11	0	0	1,98	3,92	0,50	3,00	2,7	4,61	0,58	3	0,02	44,5	0,44944	0,0975	0	0
12	1	1	5,89	7,54	0,78	1,00	5,84	7,03	0,83	1	0,06	238	0,2521	0,0359	0	0
13	1	1	3,64	5,00	0,73	1,00	5,65	7,75	0,73	2	0,08	140	0,57143	0,0737	0	0
14	1	1	2,77	3,09	0,90	6,00	3,52	3,11	1,13	2	0,02	71,9	0,27816	0,0894	0	1
15	1	1	4,03	2,70	1,49	13,00	3,54	3,02	1,17	2	0,08	121	0,66116	0,2189	1	0
16	0	0	2,48	3,94	0,63	3,00	1,5	3,25	0,46	2	0,03	132	0,22727	0,0699	0	0
17	1	1	7,12	7,97	1,12	1,00	13,62	18,94	0,72	1	0,08	145	0,55172	0,0291	0	1
18	1	1	2,19	3,67	0,59	7,00	2,74	2,68	1,02	17	0,08	127	0,62992	0,235	1	1
19	1	1	4,75	5,66	0,84	3,00	5,76	4,34	1,32	8	0,17	182	0,93407	0,2152	1	1
20	1	1	2,12	3,56	0,60	1,00	5,18	7,56	0,69	4	0,2	52,7	3,79507	0,502	1	1
21	1	1	1,90	2,84	0,66	6,00	2,76	3,35	0,82	4	0,02	161	0,12422	0,0371	0	0
22	1	1	7,45	13,37	0,56	7,00	8,59	5,73	1,49	8	0,14	37,9	3,69393	0,6447	1	1
23	1	1	6,36	2,87	2,21	13,00	5,02	4,47	1,12	5	0,1	148	0,67568	0,1512	0	1
24	0	0	2,01	3,90	0,52	2,00	1,96	3,78	0,51	16	0,04	287	0,13937	0,0369	0	1
25	1	1	5,22	4,70	1,11	18,00	3,36	2,96	1,13	10	0,02	342	0,05848	0,0198	1	0
26	1	1	3,81	6,66	0,57	1,00	6,65	6,8	0,98	10	0,74	163	4,53988	0,6676	1	0
27	1	1	6,62	6,21	1,07	6,00	4,68	4,57	1,02	5	0,02	80	0,25	0,0547	0	0

OB1= bandas oligoclonais no ponto 1; OB2= bandas oligoclonais no ponto 2; QIgG= quociente IgG; Qalb= quociente albumina;

I.IgG= índice IgG; I.IgM= índice IgM; QIgM= quociente IgM; Cel= número de leucócitos no LCR; R IgM= diagrama Reiber IgM;

Gd+= captação de gadolínio na RM; 1= positivo; 0= negativo; NA= não avaliado.

APÊNDICE 4- Parâmetros do LCR e captação de gadolínio na IRM

P	OB1	OB2	Q IgG1	Q ALB1	I. IgG1	Cel1	QlgG2	QAlb2	I.IgG2	Cel2	IgML2	IgMs2	QlgM2	I.IgM2	R IgM +	Gd +
28	1	1	5,25	4,37	1,20	6,00	2,68	3,29	0,81	3	0,07	120	0,58333	0,1773	1	0
29	1	1	1,23	3,23	0,38	1,00	1,88	3,17	0,59	3	0,04	121	0,33058	0,1043	0	NA
30	1	1	7,41	6,46	1,14	4,00	6,85	5,53	1,23	3	0,07	108	0,64815	0,1172	0	0
31	1	1	11,50	6,79	1,69	13,00	6,98	6,44	1,08	14	0,08	144	0,55556	0,0863	0	0
32	1	1	3,00	3,40	0,88	3,00	3,74	3,89	0,96	5	0,04	71,5	0,55944	0,1438	0	0
33	0	0	3,83	9,28	0,41	1,00	3,69	8,5	0,43	1	0,04	127	0,31496	0,0371	0	0
34	0	0	4,00	10,80	0,37	1,00	3,22	6,9	0,46	4	NA	NA	NA	NA	NA	0
35	1	1	4,10	6,12	0,67	1,00	4,23	7,25	0,58	1	0,08	127	0,62992	0,0869	0	0
36	1	1	4,80	5,90	0,81	16,00	6,32	6,97	0,91	10	0,08	178	0,44944	0,0645	0	0
37	1	1	4,29	3,43	1,25	2,00	2,58	3,17	0,81	1	0,02	77,3	0,25873	0,0816	1	0
38	0	0	0,98	1,66	0,59	1,00	1,61	4,18	0,38	1	0,02	89,6	0,22321	0,0534	0	0
39	1	1	10,70	7,50	1,42	15,00	10	14	1,4	25	NA	NA	NA	NA	NA	NA
40	1	1	1,40	3,79	0,37	4,00	2,82	4,24	0,66	3	0,02	153	0,13072	0,0308	0	0
41	1	1	3,68	4,28	0,86	1,00	1,93	3,77	0,51	2	0,03	81,1	0,36991	0,0981	0	0
42	0	0	2,44	4,82	0,50	8,00	1,72	3,25	0,53	1	0,02	288	0,06944	0,0214	0	0
43	1	0	3,00	4,00	0,74	24,00	3,22	4,86	0,66	8	0,06	175	0,34286	0,0705	0	1
44	1	1	2,07	3,95	0,52	1,00	1,81	4,18	0,43	3	0,06	172	0,34884	0,0835	0	1
45	1	1	3,72	6,17	0,60	5,00	3,57	5,49	0,65	3	0,02	80,1	0,24969	0,0455	0	0
46	1	1	12,10	5,10	2,37	18,00	8,58	5,21	1,64	7	0,13	241	0,53942	0,1035	0	0
47	1	1	10,60	6,38	1,66	5,00	12,7	5,16	2,46	7	0,08	234	0,34188	0,0663	0	0
48	1	1	9,56	6,80	1,41	46,00	3,76	2,53	1,48	6	0,04	260	0,15385	0,0608	0	1
49	0	0	1,61	2,93	0,55	3,00	3,14	5,84	0,53	3	0,08	154	0,51948	0,089	0	0
50	0	0	3,46	6,29	0,55	1,00	2,28	5,26	0,44	2	0,03	137	0,21898	0,0416	0	0
51	1	1	3,86	3,88	0,99	31,00	2,56	4,19	0,61	3	0,04	67,4	0,59347	0,1416	0	0
52	0	0	2,06	2,71	0,76	2,00	2,61	3,52	0,74	2	0,03	180	0,16667	0,0473	0	0
53	1	1	5,54	5,37	1,03	4,00	6,14	4,87	1,26	7	0,02	133	0,15038	0,0309	0	1
54	1	0	3,50	4,00	0,80	5,00	2,25	3,98	0,56	4	0,02	145	0,13793	0,0347	0	1

OB1= bandas oligoclonais no ponto 1; OB2= bandas oligoclonais no ponto 2; QlgG= quociente IgG; Qalb= quociente albumina;

I.IgG= índice IgG; I.IgM= índice IgM; QlgM= quociente IgM; Cel= número de leucócitos no LCR; R IgM= diagrama Reiber IgM;

Gd+= captação de gadolínio na RM; 1= positivo; 0= negativo; NA= não avaliado.

APÊNDICE 5 – IRM quantitativa e parâmetro do LCR em pacientes EM

P	VTL1	VTL2	Np1	Np2	VC1	VC2	Gd +	EBV	T- tau	P- Tau
1	8,21	9,5	55	49	859374	861720	0	1	NA	NA
2	1,81	0,77	16	4	824652	824076	0	1	NA	NA
3	18,40	26,1	143	149	1084752	1080930	1	1	NA	NA
4	0,00	0	0	0	1042830	1061814	0	0	187	18,7
5	5,18	5,97	33	41	943284	936312	1	1	225	17,8
6	3,58	3	7	22	941208	922398	0	0	214	16,3
7	7,57	11,4	67	63	932364	926322	1	0	NA	NA
8	NA	8,61	NA	59	NA	NA	0	0	NA	NA
9	1,86	1,06	17	8	1063452	1118730	0	1	NA	NA
10	14,94	17,34	31	38	899460	902886	0	0	216	19,3
11	8,75	8,92	82	33	1019346	1012290	0	1	214	17,1
12	12,10	5,9	71	36	815166	763860	0	1	221	28,3
13	27,72	30,2	135	115	1074684	1065132	0	1	NA	NA
14	19,61	25,94	120	81	931332	887856	1	0	NA	NA
15	12,40	8,6	94	69	862476	907446	0	0	NA	NA
16	8,20	14,97	27	43	1016394	1016346	0	0	NA	NA
17	13,64	6,51	67	56	902400	1016682	1	1	NA	NA
18	30,33	52,15	122	95	971460	964764	1	0	219	34,3
19	11,85	13,58	138	117	936060	947016	1	1	215	37,4
20	16,63	18,57	119	119	834336	858726	1	1	NA	NA
21	6,33	6,6	42	43	950760	949818	0	0	212	34,3
22	3,55	5	24	36	1022322	1058502	1	0	225	37,4
23	10,30	28,81	66	105	932898	953034	1	0	218	24,9
24	6,90	13,31	81	77	934794	990516	1	0	217	28,1
25	11,69	9,36	166	84	902742	893958	0	0	215	37,4
26	44,49	28,78	126	135	985758	1077888	0	0	NA	NA
27	15,71	18,41	109	108	1065012	1064442	0	1	224	28,1

VTL= volume total de lesões; Np= número de placas; VC= volume cerebral (medida de atrofia)

EBV= presença de anticorpos Epstein-Barr Virus no LCR; T-tau= tau total; P-tau= tau fosforilada.

Gd+= captação de gadolínio na RM; 1= positivo; 0= negativo; NA= não avaliado.

APÊNDICE 6- IRM quantitativo e parâmetros do LCR em pacientes EM

P	VTL1	VTL2	Np1	Np2	VC1	VC2	Gd +	EBV	T- tau	P- Tau
28	23,38	22,89	57	80	929712	926034	0	0	216	39,9
29	4,78	1,5	30	45	852144	734766	NA	0	NA	NA
30	15,01	19	69	73	939342	964998	0	1	NA	NA
31	9,98	25,09	85	61	756726	802980	0	0	225	34,3
32	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0	0	224	45
33	7,80	6,2	53	38	820248	892806	0	0	NA	NA
34	0,00	0	0	0	900204	908538	0	0	NA	NA
35	NA	9	NA	58	NA	NA	0	0	225	37
36	2,20	2,61	33	22	972252	904122	0	1	216	24,9
37	10,78	14,14	73	68	921888	917556	0	1	NA	NA
38	59,60	57,52	172	173	993744	1058352	0	0	NA	NA
39	44,08	87	130	172	1020930	1016670	NA	0	NA	NA
40	10,79	11,65	62	67	1074390	1098444	0	0	214	37,4
41	8,52	13,71	84	110	952116	986388	0	0	236	29,8
42	34,27	34,63	91	84	883170	891900	0	0	NA	NA
43	12,08	4,37	64	119	957978	1001322	1	0	238	46,7
44	0,21	0,16	3	2	1012254	990384	1	0	215	15,6
45	5,00	2,12	23	21	1078884	972798	0	1	217	39,5
46	0,35	0,87	12	8	989478	986748	0	1	NA	NA
47	NA	1,77	NA	19	NA	NA	0	1	NA	NA
48	37,71	69,04	77	78	931866	931008	1	1	217	32,1
49	1,65	1,62	17	13	923544	927954	0	1	NA	NA
50	0,00	0	0	0	840294	838476	0	0	227	44,2
51	NA	3,06	NA	33	NA	NA	0	0	216	21,8
52	42,95	18,65	86	101	812706	810690	0	0	NA	NA
53	8,23	19,82	102	82	1074222	1011870	1	1	NA	NA
54	23,56	14,28	118	73	1048758	1037688	1	0	221	32,6

VTL= volume total de lesões; Np= número de placas; VC= volume cerebral (medida de atrofia)

EBV= presença de anticorpos Epstein-Barr Vírus no LCR; T-tau= tau total; P-tau= tau fosforilada.

Gd+= captação de gadolínio na RM; 1= positivo; 0= negativo; NA= não avaliado.

APÊNDICE 7- Quantificação de volume cerebral (medida de atrofia) em pacientes saudáveis

CS	idade, anos	Volume cerebral (mm3)
1	21	1104645
2	41	1043849
3	34	1227390
4	62	1131654
5	20	916037
6	22	1270235
7	30	1068311
8	25	1236138
9	21	1078860
10	26	1304898
11	45	1060254
12	35	1122346
13	25	1402355
14	22	1221204
15	46	1027756
16	36	1114634
17	38	1205954
18	35	996512
19	35	1038510

CS= controle de pacientes saudáveis

APÊNDICE 8- Análise das citocinas em pacientes com EM em remissão clínica

P	IFN γ SORO	IFN γ LCR	TNF α SORO	TNF α LCR	IL10 SORO	IL10LCR	IL12 SORO	IL12 LCR
1	299	371	36,3	127,7	256,5	465,6	34,3	40,1
2	471	337,7	77,3	177	568,8	424,1	28,5	40,1
3	504	251	187,6	267,2	251,8	235,3	57,3	34,8
4	454,3	356	35,9	100,1	214,5	169,8	31	32,9
5	617,7	451	19,5	38,2	299,6	371,4	54,8	61
6	424,3	327,7	0	34,5	303,4	260,8	77,6	50,7
7	641	369,3	118	8,3	268,2	197	28,5	26,3
8	909,3	374	41,2	44,5	228,9	194,3	60,4	64
9	641	369,3	166,6	23,4	204,4	214,5	46,5	33,5
10	304,3	319,3	319,8	273,6	198	165,1	85,1	50,4
11	351	256	0	33,7	360,8	346,4	28,5	30,1
12	454,9	367,7	124	348,6	289,5	284,2	92,1	37,1
13	364,3	339	94,9	0	242,7	201,2	39,3	42,1
14	407,7	352,7	80	289,7	368,8	335,3	34	43,5
15	766	537,7	487,5	272,5	487,5	272,5	48,2	41,8
16	410	356	234,5	55,4	394,3	329,4	47,7	23,3
17	341	307,7	194,2	214,6	218,8	185,3	54,8	3,6
18	502,7	241	66,4	5,9	155,7	222,5	41,8	47,1
19	704,3	583,3	209,1	81,4	522,5	589	59	40,7
20	1621	407,7	194,9	0	346,4	224,6	42,6	51
21	359	264	135	39,4	215,6	218,8	38,2	34,3
22	308	332	166	126	463	229	89,8	69,6
23	442	370	356	302	239	280,5	43,7	41,2

P= pacientes; unidade= pg/ml; 0= indetectável

APÊNDICE 9- Análise das citocinas em pacientes com outras doenças neurológicas (ODN)

P	IFN γ SORO	IFN γ LCR	TNF α SORO	TNF α LCR	IL10 SORO	IL10LCR	IL12 SORO	IL12 LCR
1	504,3	364,3	0	0	521,4	419,3	47,9	63,2
2	330,4	237,6	0	0	177	194,2	85,1	32,6
3	380,2	364,3	0	0	659,2	252,8	68,5	41,8
4	477,6	437,6	0	0	455,5	269,5	61,5	52,9
5	486	407,6	0	0	410,3	433,7	61,8	47,3
6	439,3	279,3	0	0	515,8	514,3	167,1	179
7	401	281	0	94,1	410,3	424,1	89	37,9
8	361	304,3	0	0	586,9	546,4	59,3	61,5
9	347,6	307,6	0	0	635,8	495,9	78,2	47,1
10	258	210	0	0	298,6	423,6	120,4	65,1
11	354,3	297,6	76,2	0	342,2	433,1	47,6	40,1
12	511	449,3	0	0	361,9	339	62,9	59
13	317,6	247,6	0	0	693,2	656	71,2	56,5
14	381	239,3	0	0	924,1	385,8	60,4	34
15	442,6	336	0	0	623	405	63,5	52,9
16	479,0	311,0	0	0	504,0	430,0	73,2	59,8

P= pacientes; unidade= pg/ml; 0= indetectável

APÊNDICE 10- Análise das citocinas em pacientes em LES (Lúpus Eritematoso Sistêmico)

P	IFN γ SORO	IFN γ LCR	TNF α SORO	TNF α LCR	IL10 SORO	IL10LCR	IL12 SORO	IL12 LCR
1	358	408	235	335	477,8	238,5	37,6	56,5
2	299	183	50,8	95,7	653,9	703,9	57,9	37,3
3	218	209	417	411	742,2	752,3	46,2	55,1
4	303	211	276	306	407,6	384,7	78,5	114
5	333	308	107	81,4	551,8	500,7	43,7	73,7
6	368	386	371	132	703,9	414,5	37,9	52,9
7	296	276	56,1	243	718,2	523,6	67,1	32,1
8	397	354	321	390	832,1	563,5	59	35,4
9	253	144	158	513	711,9	716,7	48,2	44
10	1414	314	1143	625	360,8	236,9	37,6	56,5
11	484	213	817	314	315,1	245,9	73,7	77,6
12	343	213	264	199	376,2	293,2	45,7	35,7
13	214	201	539	565	519,3	252,8	60,7	89
14	418	201	481	382	401,8	394,8	94,8	87,1
15	214	253	284	298	674,6	587,4	89	48,5
16	651	313	1020	640	570,4	313,5	55,4	62
17	601	366	1229	845	348,6	353,9	121	68,2
18	331	284	347	660	402,3	353,9	65,7	57,3
19	296	169	206	393	250,2	385,8	68,7	66
20	311	189	206	273	329,4	161,9	44,2	37,4
21	509	178	668	481	204,4	173,6	85,1	41,2
22	354	166	570	449	952,8	759,2	36	59,8
23	348	303	230	211	412,4	441,1	74,6	80,7

P= pacientes; unidade= pg/ml; 0= indetectável

APÊNDICE 11-Análise das citocinas em pacientes saudáveis (CS)

P	IFNγ SORO	IFNγ LCR	TNFα SORO	TNFα LCR	IL10 SORO	IL10LCR	IL12 SORO	IL12 LCR
1	68,4	26,6	0	0	408,1	345,9	68,2	62,6
2	48,9	24,8	21,7	0	339,5	292,2	30,7	22,3
3	295,3	32,3	0	0	400,2	211,3	79,3	41,8
4	78,5	38,8	61,3	0	275,2	465,6	96	58,7
5	67,3	28,7	0	17,3	323	394,8	35,7	23,5
6	46,5	21,8	21,7	0	274,1	240,1	55,7	41,8
7	69,1	46,9	15,8	21,7	298,6	216,1	67,3	72,1
8	63,2	49,8	0	0	308,1	298	81,8	73,7
9	160,5	52,8	0	0	429,4	323	31,5	21,8
10	72,2	80,3	17,3	3,8	168,8	155,5	57,4	51,8
11	82,9	54,6	0	0	287,9	240,1	37,3	32,3
12	84,1	161,5	0	0	644,3	292,7	51,5	41,8
13	72,8	40,9	0	0	379,4	315,1	83,9	61,2
14	62,1	45,4	0	0	359,2	315,6	61,9	41,8
15	62,5	38,8	27,6	7,4	272	255	56,5	47,9
16	78,2	49,1	0	0	226	219,3	43,2	27,3
17	81,4	51,4	0	0	483,1	389,5	42,9	37,5
18	83,2	53,7	47,2	12,4	333,1	319,3	63,5	39
19	74,5	50,5	0	0	527,3	338,5	46	40,7

P= pacientes; unidade= pg/ml; 0= indetectável

APÊNDICE 12- Quantificação de proteínas T-tau

EMt	C	EMnt	C	CS	I, anos	C
1	187	1	213	1	26	159
2	225	2	269	2	45	154
3	214	3	256	3	35	294
4	216	4	245	4	25	106
5	214	5	246	5	22	231
6	221	6	497	6	46	132
7	219	7	217	7	36	56
8	215	8	257	8	38	108
9	212	9	214	9	35	219
10	225	10	225	10	35	281
11	218	11	249			
12	217	12	222			
13	215	13	226			
14	224					
15	216					
16	225					
17	224					
18	225					
19	216					
20	214					
21	236					
22	238					
23	215					
24	217					
25	217					
26	227					
27	216					
28	221					

EMt = pacientes com esclerose múltipla em tratamento

EMnt = pacientes com esclerose múltipla antes do início do tratamento

CS = pacientes

APÊNDICE 13- Quantificação de proteínas P-tau em pacientes EM e controles

EMt	C	EMnt	C	CS	I, anos	C
1	18,7	1	31,2	1	26	36,7
2	17,8	2	31,9	2	45	137,5
3	16,3	3	47,8	3	35	53,1
4	19,3	4	59,3	4	25	85
5	17,1	5	31,3	5	22	33,7
6	28,3	6	34	6	46	34,3
7	34,3	7	28,1	7	36	77,3
8	37,4	8	18,7	8	38	14,4
9	34,3	9	31,2	9	35	52,5
10	37,4	10	30,5	10	35	81,4
11	24,9	11	52,8			
12	28,1	12	24,6			
13	37,4	13	40,4			
14	28,1					
15	39,9					
16	34,3					
17	45					
18	37					
19	24,9					
20	37,4					
21	29,8					
22	46,7					
23	15,6					
24	39,5					
25	32,1					
26	44,2					
27	21,8					
28	32,6					

EMt = pacientes com esclerose múltipla em tratamento

EMnt = pacientes com esclerose múltipla antes do início do tratamento

CS = pacientes
saudáveis