



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CLAUDIA MARA RIBEIRO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O FATOR DE NECROSE TUMORAL  
ALFA E SEUS RECEPTORES SOLÚVEIS COM O  
DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA,  
INCAPACIDADE, PROGRESSÃO E FORMAS CLÍNICAS**

---

Londrina  
2019

**CLAUDIA MARA RIBEIRO**

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O FATOR DE NECROSE TUMORAL  
ALFA E SEUS RECEPTORES SOLÚVEIS COM O  
DIAGNÓSTICO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA,  
INCAPACIDADE, PROGRESSÃO E FORMAS CLÍNICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Co-orientadora: Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ribeiro, Claudia Mara .

Associação entre o fator de necrose tumoral alfa e seus receptores solúveis com o diagnóstico de esclerose múltipla, incapacidade, progressão e formas clínicas / Claudia Mara Ribeiro. - Londrina, 2019.  
73 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Sayonara Rangel Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Tese. 2. Fator de necrose tumoral alfa - Tese. 3. Receptor solúvel de TNF - Tese. 4. Incapacidade - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci . II. Oliveira, Sayonara Rangel . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CLAUDIA MARA RIBEIRO

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA E  
SEUS RECEPTORES SOLÚVEIS COM O DIAGNÓSTICO DE  
ESCLEROSE MÚLTIPLA, INCAPACIDADE, PROGRESSÃO E  
FORMAS CLÍNICAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissochi  
Reiche  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Carlos Eduardo Coral de Oliveira  
Pontifícia Universidade Católica – PUC

Londrina, 20 de fevereiro de 2019.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo cuidado e amor dispensados a mim em todos os momentos e por tornar esta caminhada possível.

Aos meus filhos Alan, Nicole e Kelvin pelo carinho, incentivo, apoio e compreensão nos momentos de ausência. Vocês são especiais.

Aos meus pais Rubens e Raquel pelo apoio incondicional, amor, cuidado e por tornarem esta trajetória mais amena.

À minha irmã Ana Paula pelo carinho, apoio, mensagens de ânimo e o bom humor de sempre.

À minha orientadora Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche pelos conhecimentos transmitidos, dedicação, atenção e orientação ao longo desse trabalho.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Sayonara Rangel Oliveira pela disponibilidade, colaboração, amizade e por me desafiar em vários momentos.

Aos meus amigos do Setor de Toxicologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, pelo companheirismo, compreensão e incentivo.

Às amigas Daniela Frizon Alfieri e Tamires Flauzino pelo apoio e fundamental contribuição neste trabalho.

RIBEIRO, Claudia Mara. **Associação entre o fator de necrose tumoral alfa e seus receptores solúveis com o diagnóstico de esclerose múltipla, incapacidade, progressão e formas clínicas.** 2019. 73 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica desmielinizante, neurodegenerativa do sistema nervoso central e mediada pela resposta imune. Sua etiologia é multifatorial e envolve a interação entre fatores genéticos, hormonais, ambientais e epigenéticos. Diferentes mecanismos lesivos estão envolvidos na fisiopatologia da EM como a desregulação da resposta imune inata e adaptativa, estresse oxidativo, alterações metabólicas e disfunção mitocondrial. Estes diferentes mecanismos podem explicar a heterogeneidade da doença quanto aos sintomas e formas clínicas, incapacidade, progressão da doença e resposta terapêutica apresentadas pelos pacientes acometidos. O fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e seus receptores estão entre os possíveis mediadores desta heterogeneidade. Estudos que avaliam a associação entre o TNF- $\alpha$  e as formas solúveis de seus receptores sTNFR1 e sTNFR2 com as características clínicas e laboratoriais da EM em diferentes populações mundiais apresentam resultados conflitantes.

**Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi avaliar se os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e dos seus receptores estão associados ao diagnóstico de EM, a incapacidade, progressão da doença e formas clínicas.

**Métodos:** Foram avaliados 168 pacientes com EM de ambos os sexos, com idade entre 18 a 70 anos atendidos no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina e 70 indivíduos saudáveis, selecionados entre doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina e da população em geral. Os pacientes foram classificados em EM remitente-recorrente (EMRR) e EM progressiva, que compreende as formas EM primária progressiva e EM secundária progressiva. A incapacidade foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) e categorizada como leve (EDSS <3,0) ou moderada/alta (EDSS  $\geq$ 3,0). A progressão da doença foi avaliada utilizando a escala *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS) e foi considerada progressão quando MSSS  $\geq$ 5,0. Os dados sociodemográficos, antropométricos, epidemiológicos e clínicos foram obtidos utilizando um questionário padronizado. Amostras do sangue periférico foram coletadas para determinação dos níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$  e dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 por imunofluorimetria.

**Resultados:** A forma EMRR foi diagnosticada em 147 (87,5%) pacientes e as formas clínicas progressivas em 21 (12,5%) pacientes, incluindo 4 (2,4%) com EM primária progressiva (EMPP) e 17 (10,1%) com EM secundária progressiva (EMSP). O diagnóstico de EM apresentou um efeito de 44,6% nos níveis de TNF- $\alpha$  e 12,3% nos níveis de sTNFR2. As variáveis idade ( $P < 0,001$ ) e os níveis plasmáticos de sTNFR1 ( $P = 0,007$ ) foram associadas positivamente com incapacidade moderada/grave. Além disso, sTNFR1 ( $P = 0,002$ ) e idade ( $P = 0,028$ ) foram positivamente associados com a progressão da doença. Quanto às formas clínicas, a idade ( $P < 0,001$ ), o sexo masculino ( $P = 0,029$ ) e sTNFR1 ( $P = 0,049$ ) foram associados positivamente, enquanto o sTNFR2 ( $P = 0,045$ ) foi associado negativamente com formas clínicas progressivas da EM. Além disso, um novo escore proposto refletindo a relação sTNFR1/sTNFR2 mostrou uma associação significativa e positiva com as formas clínicas progressivas da EM após ajuste para idade e sexo.

**Conclusão:** Os resultados mostraram que o TNF- $\alpha$  e as formas solúveis de seus receptores

sTNFR1 e sTNFR2 estão envolvidos na patogênese da EM; enquanto os níveis de sTNFR1 foram associados com incapacidade, progressão da doença e formas clínicas mais progressivas, níveis elevados observados de sTNFR2 nos pacientes podem ser uma resposta compensatória exercendo um efeito protetor na modulação dos mecanismos imunopatológicos da EM.

**Palavras-chave:** Esclerose múltipla. Fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . Receptor solúvel de TNF. Incapacidade.

RIBEIRO, Claudia Mara. **Association between tumor necrosis factor alpha and its soluble receptors with diagnosis of multiple sclerosis, disability, disability progression and clinical forms.** 2019. 73 p. Dissertation (Masters Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory, demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system that is mediated by the immune response. Its etiology is multifactorial and involves the interaction between genetic, hormonal, environmental and epigenetic factors. Different damaging mechanisms are involved in the pathophysiology of MS, such as dysregulation of the innate and adaptive immune response, oxidative stress, metabolic alterations and mitochondrial dysfunction. These different mechanisms may explain the heterogeneity of the disease regarding the clinical symptoms, clinical forms, disability, disease progression and therapeutic response presented by the affected patients. Cytokines and their receptors are among the possible mediators of this heterogeneity. Studies evaluating the association between tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and the soluble forms of its receptors (sTNFR) 1 and sTNFR2 with the clinical and laboratory characteristics of MS in different worldwide populations show conflicting results and are scarce in the Brazilian population.

**Objectives:** The objective of the present study was to verify whether the TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 are associated with the diagnosis of MS, disability, disease progression and clinical forms of MS, as well as with some cytokines.

**Methods:** The study included 168 patients with MS, adults, both sexes, attended at the Ambulatory of Demyelinating Diseases of the Outpatient Clinic of the University Hospital of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, and 70 healthy individuals, blood donors from the Regional Blood Center of Londrina and from general population. Disability was assessed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and categorized as mild (EDSS <3.0) or moderate/high (EDSS  $\geq$ 3.0). Disease progression was assessed using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Sociodemographic, anthropometric, epidemiological and clinical data were obtained using a standardized questionnaire. Peripheral blood samples were obtained for the determination of inflammatory biomarkers such as TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-4, IL-10, IL-17, sTNFR1 and sTNFR2 using immunofluorimetric assay.

**Results:** Recurrent-relapsing MS (RRMS) was diagnosed in 147 (87.5%) patients and progressive clinical forms in 21 (12.5%) patients, including 4 (2.4%) with primary progressive MS (PPMS) and 17 (10.1%) with secondary progressive MS (SPMS). The diagnosis of MS exerted an effect of 44.6% on TNF- $\alpha$  levels and 12.3% on sTNFR2 levels. The variables age ( $P < 0.001$ ) and sTNFR1 ( $P = 0.007$ ) were positively associated with moderate/severe disability. In addition, sTNFR1 ( $P = 0.002$ ) and age ( $P = 0.028$ ) were positively associated with disease progression. Regarding clinical forms, age ( $P < 0.001$ ), male sex ( $P = 0.029$ ) and sTNFR1 ( $P = 0.049$ ) were positively associated, whereas sTNFR2 ( $P = 0.045$ ) was negatively associated with progressive clinical forms of MS. In addition, a new score composition was proposed reflecting the sTNFR1 / sTNFR2 ratio showed a significant and positive association with the progressive clinical forms of MS after adjusting for age and sex.

**Conclusion:** The results showed that TNF- $\alpha$  and its soluble receptors (sTNFR1 and sTNFR2) are involved in the pathogenesis of MS; while sTNFR1 was associated with disability, disability progression and progressive clinical forms, high levels of sTNFR2 observed in the patients may be a compensatory response exerting a protective effect modulating the

immunopathological mechanisms of MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ . Soluble TNF receptor. Disability. Cytokines.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AKT	<i>protein kinase B</i> (Proteína quinase B)
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
BHE	Barreira hematoencefálica
CIS	<i>Clinicaly isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMPR	Esclerose Múltipla Progressiva Recidivante
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HU	Hospital Universitário
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-26	Interleucina 26
IMC	Índice de massa corporal
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> (lipoproteína de baixa densidade)

LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIF	<i>Leukemia inhibitor factor</i> (Fator inibidor de leucemia)
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> (Proteína-quinases ativadas por mitógenos)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo maior de histocompatibilidade)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa B</i> (Fator nuclear <i>kappa B</i> )
RMN	Ressonância magnética nuclear
SNC	Sistema nervoso central
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> (Fator de transformação do crescimento $\beta$ )
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> (Fator de necrose tumoral $\alpha$ )
TNFtm	<i>Tumor necrosis factor transmembrane</i> (Fator de necrose tumoral transmembrana)
TNFsol	<i>Tumor necrosis factor soluble</i> (Fator de necrose tumoral solúvel)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão das células vasculares 1
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i> (Antígeno 4 muito tardio)

## SUMÁRIO

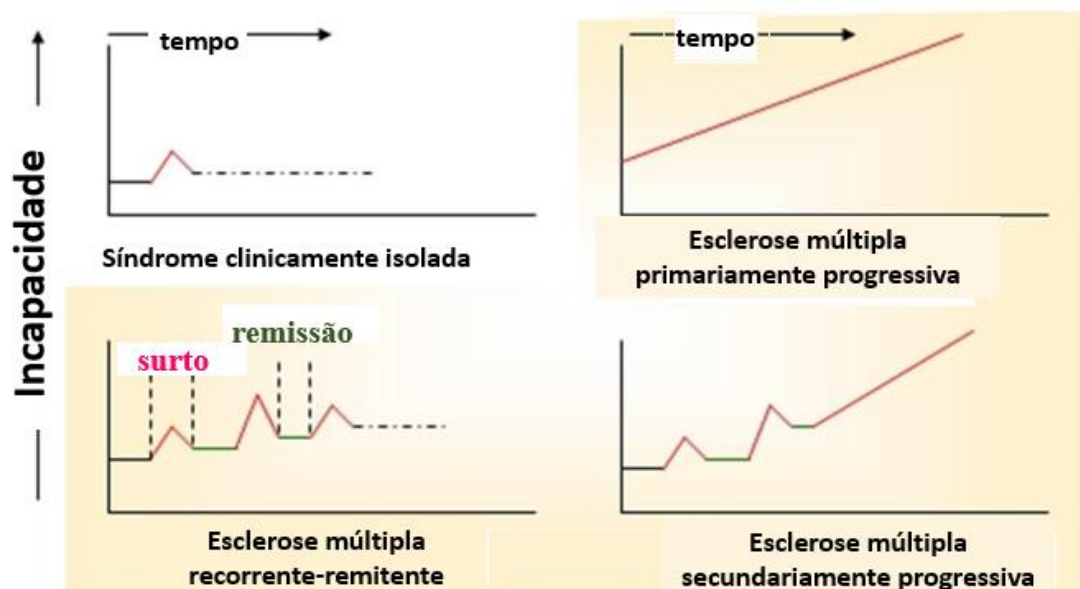
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Epidemiologia da EM</b> .....	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Etiologia e fisiopatologia da EM</b> .....	<b>14</b>
<b>1.2.1</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math> e seus receptores</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>Diagnóstico e tratamento da EM</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Amostra</b> .....	<b>30</b>
<b>4.4</b>	<b>Critério de exclusão</b> .....	<b>31</b>
<b>4.5</b>	<b>Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos</b> .....	<b>31</b>
<b>4.6</b>	<b>Coleta de material biológico</b> .....	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Marcadores inflamatórios</b> .....	<b>32</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>79</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica imuno-mediada, desmielinizante e neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) que apresenta o envolvimento de vários processos fisiopatológicos como inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos, comprometimento dos axônios, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e mecanismos de reparo como remielinização, embora estes eventos não estejam presentes em todos os pacientes de maneira uniforme (MILLER et al., 2012).

Os pacientes com EM podem apresentar uma grande variedade de sintomas clínicos, incluindo alterações na visão, mobilidade, equilíbrio, cognição e função do esfíncter que são, em grande parte, determinados pela localização e extensão das lesões desmielinizantes que podem estar situadas no nervo óptico, medula espinhal, substância branca periventricular e tronco cerebral (LUBLIN et al., 2014; MILO; MILLER, 2014).

De acordo com a classificação recentemente revisada do curso clínico da EM, há quatro fenótipos principais: síndrome clinicamente isolada (CIS), remitente-recorrente (EMRR), primariamente progressiva (EMPP) e secundariamente progressiva (EMSP) (LUBLIN et al., 2014; THOMPSON et al., 2018a). A forma CIS é a manifestação inicial e mais comum da EM, afeta os nervos ópticos, tronco cerebral ou medula espinhal. Pode ser definida como um episódio agudo ou subagudo de disfunção neurológica devido à desmielinização inflamatória que dura mais de 24 horas e ocorre na ausência de febre, infecção e encefalopatia (BROWNLEE; MILLER, 2014). A EMRR é a forma mais frequente da doença e representa, aproximadamente, 80% de todos os casos no início da doença e é caracterizada pela presença de surtos bem definidos com recuperação parcial ou completa dos sintomas e ausência de progressão entre os episódios (KOCH et al., 2007; MARQUES, 2010). A forma EMSP é uma evolução natural da EMRR em 30 a 40% dos casos após 10 anos do diagnóstico. Constata-se uma deterioração contínua das funções neurológicas e constitui, cerca de, 15 a 20% de todas as formas de EM num dado momento. A EMPP apresenta-se com o curso progressivo desde o início dos sintomas e evolui de forma lenta e estável, sem surtos aparentes e acomete em torno de 10-15% dos pacientes com EM (MARQUES, 2010). A Figura 1 ilustra as principais formas clínicas da EM.



**Figura 1** Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla.

Fonte: Adaptado de sbv IMPROVER Systems Biology Verification. Disponível em:

< <https://www.sbvimprover.com/challenge-1/challenge/ms-stage> >. Acesso em 09 jan. 2019.

O grau de incapacidade em pacientes com EM pode ser avaliado utilizando-se a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), sugerida por Kurtzke (1983), um método de quantificar as incapacidades ocorridas durante a evolução da doença ao longo do tempo. A escala varia de 0 a 10 e quantifica a incapacidade em oito sistemas funcionais (SF): piramidais, cerebelares, do tronco cerebral, sensitivas, vesicais, intestinais, visuais e mentais (KURTZKE, 1983). Na maioria dos estudos, os pacientes são categorizados com incapacidade leve ( $EDSS < 3,0$ ) ou moderada/grave ( $EDSS \geq 3,0$ ) (KALLAUR et al., 2017).

Ao longo do tempo, os pacientes com EM podem apresentar alterações nos escores de incapacidade. A progressão da incapacidade pode ser avaliada utilizando a variação do EDSS em tempos diferentes ( $EDSS \text{ no tempo } 2 - EDSS \text{ no tempo } 1 = \Delta EDSS$ ). Para pacientes com um  $EDSS < 6,0$ , o aumento de pelo menos um ponto completo é considerado como progressão da incapacidade, enquanto que para os pacientes com  $EDSS \geq 6,0$  um agravamento de, pelo menos, meio ponto é necessário para ser considerado como progressão da incapacidade (KOCH et al., 2007). Outra forma de avaliar a progressão da doença é pelo uso do escore de gravidade da esclerose múltipla (*Multiple Sclerosis Severity Score*, MSSS), atualmente, considerado como o melhor método para avaliação do acúmulo

de incapacidade na EM ao longo do tempo (MANDIA et al., 2014). Proposto por Roxburgh et al. (2005), uma pontuação do MSSS é atribuída de acordo com o EDSS de um paciente, comparado com o EDSS de uma ampla base de dados de pacientes com duração semelhante da doença. O escore  $> 5,0$  denota velocidade maior que a média de acúmulo de incapacidade (KOCH et al., 2015).

## 1.1 Epidemiologia da EM

Estima-se que mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo sofram de EM, sendo considerada uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica em adultos jovens (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). Na maioria dos casos, a idade de início da doença ocorre entre 20 e 40 anos de idade e as mulheres são duas a três vezes mais afetadas que os homens (OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018). Estudos mostram que as mulheres iniciam a doença antes que os homens; todavia, há uma discreta menor prevalência da doença progressiva primária no sexo feminino, assim como menor progressão da incapacidade nas mulheres do que nos homens (BERGAMASCHI, 2007). Vários genes localizados no cromossomo X apresentam potencial influência na resposta imune, e as proteínas codificadas por estes genes podem estar envolvidas nas diferenças de susceptibilidade e gravidade frente às doenças infecciosas e autoimunes. Em relação à EM, as diferenças da resposta imune relacionadas ao sexo do indivíduo são consequências de diferenças genéticas atribuídas à inativação de um cromossomo X nas mulheres, na diferença de expressão de hormônios esteroides, assim como diferentes experiências e estilos de vida (FISH, 2008).

A prevalência da EM varia consideravelmente entre os países, com valores  $< 5$  casos em 100.000 habitantes em áreas denominadas de baixo risco, como a maior parte da África e Ásia Oriental, atingindo mais que 100 casos em 100.000 habitantes nas áreas de alto risco, como norte e centro da Europa, América do Norte e sudeste da Austrália (MILO; MILLER, 2014). De fato, considera-se que esta variação ocorra em função das características étnicas, ambientais e geográficas de cada população (CORREA; PAREDES; MARTINEZ, 2016). A prevalência de EM tem aumentado no decorrer dos anos, especialmente em mulheres esta descoberta pode representar um verdadeiro aumento da doença, mas também pode ser atribuído a uma melhoria no acesso ao serviço médico e

maior precisão no seu diagnóstico (ALONSO; HERNAN, 2008; KOCH- HENRIKSEN; SORENSEN, 2010).

No Brasil, de acordo com uma revisão sistemática publicada por Pereira et al. (2015), a prevalência média encontrada foi de 8,69 casos em 100.000 habitantes. No entanto, devido a aspectos geográficos, demográficos e históricos de cada região, observou-se uma grande variabilidade entre os valores máximos e mínimos, que oscilaram entre 27,2 casos em 100.000 habitantes na região Sul e 1,36 casos em 100.000 habitantes na região Nordeste. Além disso, seguindo o perfil mundial, a EM no Brasil afeta com maior frequência mulheres e caucasianos (VASCONCELOS et al., 2016).

## **1.2 Etiologia e fisiopatologia da EM**

A etiologia da EM ainda não é totalmente esclarecida; porém, sugere-se que fatores genéticos, epigenéticos e ambientais interagindo com fatores de risco modificáveis estejam envolvidos com a patogênese da doença (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2017). Ainda não está claro quais fatores são responsáveis pela heterogeneidade na apresentação clínica e curso clínico da EM, assim como diferenças nas alterações morfológicas observadas na ressonância magnética nuclear (RMN) e na avaliação histopatológica, funções neurológicas afetadas e resposta ao tratamento. Evidências sugerem que esta heterogeneidade seja atribuída aos diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos da EM, como desregulação da resposta imune inata e adaptativa, estresse oxidativo e alterações metabólicas, em associação com fatores genéticos e ambientais (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Entre os fatores ambientais, os mais frequentes incluem o tabagismo, obesidade, latitude geográfica (em geral a exposição ao sol e raios ultravioleta UV-B tendem a diminuir com o aumento da latitude), deficiência de vitamina D e infecções virais, principalmente envolvendo o vírus Epstein-Barr (EBV) (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). Alguns estudos têm mostrado que o microbioma intestinal, da pele e das vias aéreas poderia estar associado com respostas autoimunes e inflamatórias, contribuindo para a patogênese na EM (CHU et al., 2018).

Mais de 100 variantes genéticas têm sido consideradas de risco para o desenvolvimento da EM, cada variante teria um pequeno efeito no risco da doença e

diferentes combinações dessas variantes provavelmente contribuem para a suscetibilidade em diferentes pacientes (SOSPEDRA; MARTIN, 2016; BARANZINI; OKSENBERG, 2017). A maioria dessas variantes codifica moléculas envolvidas no sistema imunológico, tais como os genes *HLA* no cromossomo 6, incluindo polimorfismos nos alelos *HLA-DRB1\*15:01*, *HLA-DRB1\*0301* e *HLA-DRB1\*1303* expressos nas células da resposta imune inata que estão associados a um maior risco do que outros distúrbios imunológicos sistêmicos (HEMMER et al., 2015). Alguns polimorfismos, particularmente aqueles nos *loci* *HLA*, podem interagir com fatores de risco ambientais. Por exemplo, o alelo *HLA-DRB1\*15:01*, que está associado ao maior risco de EM, confere um risco significativamente maior de EM entre fumantes (HEDSTROM, 2011), em indivíduos com infecção por EBV (SUNDQVIST, 2012) e naqueles com obesidade na adolescência (HEDSTROM, 2014). Estudo prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa em pacientes com EM provenientes de Londrina e região norte do Paraná, Sul do Brasil, demonstrou que o alelo *HLA-DRB1\*15* em heterozigose foi positivamente associado à EM e poderia ser considerado um marcador genético de susceptibilidade à doença. O estudo demonstrou, também, uma associação negativa entre o alelo *HLA-DRB1\*11* em homozigose e EM, sugerindo que este alelo poderia ser considerado um marcador genético de resistência à EM nessa população (KAIMEN-MACIEL et al., 2009).

Vários componentes patogênicos podem estar presentes no curso da EM tais como inflamação, desmielinização, perda de oligodendrócitos e comprometimento axonal. De fato, estes mecanismos acontecem pela infiltração das células imune periféricas no SNC levando à formação de lesões ou placas, que são características da doença (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Além do infiltrado de células inflamatórias mononucleares, como linfócitos T (LT), monócitos/macrófagos e linfócitos B (LB), as lesões também são compostas por axônios desmielinizados, número reduzido de oligodendrócitos, axônios transecionados e proliferação de astrócitos com consequente gliose (MILO; MILLER, 2014).

Com base na infiltração das células imunes, deposição de fatores humorais e perda de oligodendrócitos e/ou proteínas da mielina, as lesões podem ser classificadas em quatro padrões distintos: os padrões I e II foram caracterizados pela presença de macrófagos, infiltração das células T com perda das proteínas da mielina. As lesões com padrão II mostraram deposição de imunoglobulina e ativação do sistema complemento ao longo da bainha de mielina. As lesões com padrão III foram caracterizadas pela presença de

infiltrado inflamatório composto principalmente pelas células T, macrófagos, micróglia ativada com apoptose dos oligodendrócitos, resultando na redução da remielinização. O padrão IV, embora raro, foi sugestivo de degeneração primária dos oligodendrócitos. Nestes dois últimos padrões é possível sugerir que o processo patológico dos pacientes com EM tem início no SNC, com componente neurodegenerativo no início da doença (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Inicialmente, as células T autorreativas foram consideradas componentes críticos para a indução da patogênese na EM uma vez que elas migram através da barreira hematoencefálica (BHE) e causam inflamação e dano tecidual no SNC (SOSPEDRA; MARTIN, 2005). Estudos também destacam os LB como componentes centrais da doença e sugerem que LB e LT autorreativos podem ser ativados na periferia para tornarem-se células efetoras (DENDROU et al., 2015; CLAES et al., 2015). Evidências indicam que a EM tem início com a ativação das células T CD4<sup>+</sup> autorreativas que escaparam dos mecanismos de tolerância central e periférica. Indivíduos geneticamente susceptíveis ao entrar em contato com estímulos ambientais, como infecção viral, podem desencadear reações imunogênicas ao reconhecer moléculas ou células com peptídeos semelhantes aos da mielina (FONTOURA; GARREN, 2010; DENDROU et al., 2015). Células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas entram em contato com o antígeno, e pela expressão de moléculas coestimulatórias e do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II, apresentam o antígeno para os linfócitos T CD4<sup>+</sup> *naïves* no tecido periférico, implicando em sua ativação (FONTOURA; GARREN, 2010). Estes linfócitos ativados podem se diferenciar em vários subtipos de células funcionalmente distintas incluindo T *helper* (Th)1, Th2, Th17 e células T regulatórias (Treg) (GRIGORIADIS; VAN PESCH, 2015; HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015).

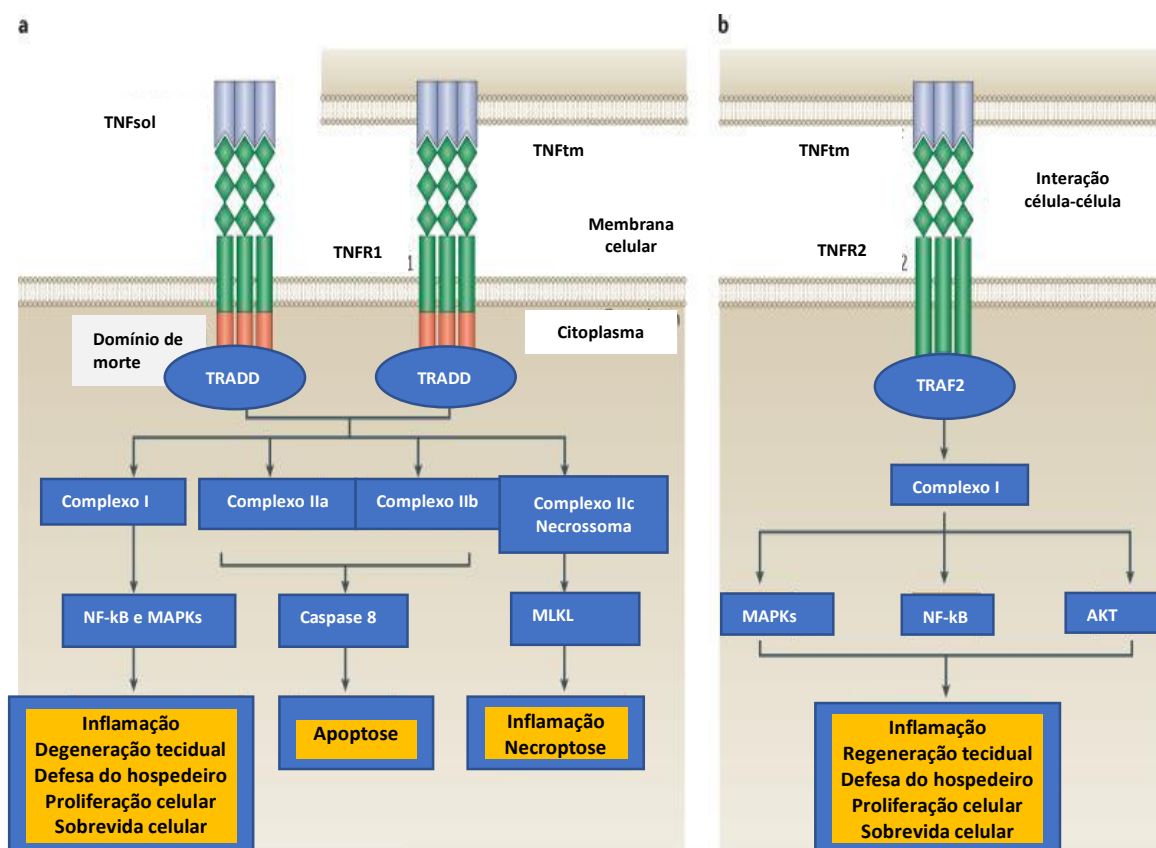
### **1.2.1 TNF- $\alpha$ e seus receptores**

TNF- $\alpha$  é uma molécula proinflamatória potente, que apresenta um componente de sinalização essencial para o sistema imune, e pode ser fortemente induzida após infecção ou dano tecidual (VAN HAUWERMEIREN; VANDENBROUCKE; LIBERT, 2011). Estudos revelaram duas funções opostas do TNF- $\alpha$  na defesa do hospedeiro. Com baixos níveis, o TNF- $\alpha$  tem funções homeostáticas benéficas, tais como os mecanismos de defesa

do hospedeiro contra patógenos intracelulares (MOOTOO et al., 2009). No entanto, em altas concentrações, o TNF- $\alpha$  pode ser deletério e promove inflamação, dano aos órgãos e tem sido associado com a patogênese de várias doenças inflamatórias, tais como artrite reumatoide e EM (TSENG et al., 2018).

TNF- $\alpha$  é produzido, principalmente, por macrófagos/monócitos ativados, incluindo a micróglia no SNC. Também pode ser secretado em baixos níveis por vários tipos celulares como células T e *natural killers* (NK), células dendríticas, LB, cardiomiócitos, fibroblastos e astrócitos. O TNF- $\alpha$  atua, também, como um coestimulador de LB e LT ativados e células NK, e aumenta a citotoxicidade de eosinófilos, monócitos e neutrófilos contra patógenos. Além disso, o TNF- $\alpha$  pode atuar junto às células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de adesão (BRADLEY, 2008; SEDGER; MCDERMOTT, 2014).

Inicialmente, o TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembrana (TNF<sub>tm</sub>) do tipo II, de 26 kDa e é expresso na superfície celular como uma molécula estável homotrimérica (PEGORETTI et al., 2018). O TNF<sub>tm</sub> pode ser liberado como TNF solúvel (TNF<sub>sol</sub>) após ser clivado por uma metaloproteinase conhecida como enzima conversora de TNF- $\alpha$  (TACE/ADAM17). Esta forma solúvel é liberada para a circulação e confere ao TNF- $\alpha$  uma potente função endócrina, uma vez que pode agir em local distante de sua síntese. Ambas as formas, TNF<sub>tm</sub> e TNF<sub>sol</sub>, exercem suas funções pela ligação com dois receptores homotriméricos transmembrana: o receptor 1 do TNF- $\alpha$  (TNFR1, CD120a ou p55), codificado pelo gene *TNFRSF1A* e o receptor 2 do TNF- $\alpha$  (TNFR2, CD120b ou p75), codificado pelo gene *TNFRSF1B* (YANG et al., 2018; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003). A Figura 2 ilustra os efeitos do TNF- $\alpha$  ao ligar-se aos receptores TNFR1 e TNFR2. Enquanto a ligação da citocina ao TNFR1 promove defesa ao hospedeiro, inflamação, proliferação celular, sobrevivência celular e degeneração tecidual, a ligação com o TNFR2 promove, além dos efeitos já descritos via TNFR1, regeneração tecidual, com importante papel no reparo tecidual (KALLIOLIAS; IVASHKIV, 2016).



**Figura 2 a:** A sinalização do receptor TNF1 (TNFR1) é ativada pelo TNF solúvel (TNFsol) e TNF transmembrana (TNFtm). O TNFR1 recruta a proteína do domínio de morte associado à proteína adaptadora ao TNFR1 (TRADD). A ligação de TNFR1 por TNFsol ou TNFtm leva, inicialmente, à montagem do complexo I, que ativa o fator nuclear *kappa* B (NFκB). A sinalização TNFR1 do complexo I induz inflamação, degeneração tecidual, sobrevivência, proliferação celular e orchestra a defesa imunológica contra patógenos. Modalidades de sinalização alternativas, associadas à morte celular programada, também podem ser ativadas a jusante do TNFR1. A formação dos complexos IIa e IIb resulta em apoptose, enquanto o complexo IIc (necrossoma) induz necroptose e inflamação. **b:** Propõe-se que o TNFR2 seja totalmente ativado primariamente pelo TNFtm, no contexto das interações célula-célula. O TNFR2 recruta o fator 2 associado ao TNFR (TRAF2) pelo seu domínio TRAF, desencadeando a formação do complexo I e a ativação de NF-κB, proteíno-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e proteína quinase B (AKT). O TNFR2 medeia bioatividades homeostáticas incluindo regeneração de tecidos, proliferação celular e sobrevivência celular. Esta via também pode iniciar efeitos inflamatórios e proteger o hospedeiro contra patógenos.

Fonte: Adaptado de Kalliolias; Ivashkiv (2016).

O TNFR1 é expresso em uma ampla variedade de células e pode ser ativado pelas formas solúvel e transmembrana do TNF, enquanto a expressão do TNFR2 é mais restrita e pode ser tipicamente encontrada em células endoteliais, imunológicas (incluindo microglia) e neuronais; e pode ser ativado somente pelo TNF<sub>tm</sub> (DOPP et al., 2002; WAJANT; PFIZENMAIER; SCHEURICH, 2003).

As formas ligadas à membrana de ambos os receptores são, também, um substrato para a clivagem proteolítica pela TACE, produzindo fragmentos de receptores solúveis, como por exemplo, o receptor de TNF- $\alpha$  solúvel (sTNFR). Este processo é um importante mecanismo de autorregulação para prevenir danos exagerados e pode contribuir para a regulação da capacidade de resposta do TNF- $\alpha$  celular. O aumento da liberação de ectodomínio tem duas consequências: (1) Por um lado, a clivagem dos receptores pode neutralizar a bioatividade do TNF- $\alpha$  circulante, sequestrando-o, assim, o sTNFR atuará como um inibidor intrínseco do TNF- $\alpha$ . (2) Por outro lado, o processo diminuirá o número de receptores competentes para sinalização na superfície celular e causará dessensibilização transitória do TNF- $\alpha$  (STEELAND; LIBERT; VANDENBROUCKE, 2018 ).

Evidências indicam que o dano causado pelo TNF- $\alpha$  nas doenças neurodegenerativas crônicas são amplamente mediadas pelo TNF<sub>sol</sub>. Experimentos com ratos transgênicos expressando TNF- $\alpha$  que não pode ser clivado, portanto prevenindo a formação de TNF<sub>sol</sub>, mostraram significativa proteção contra a indução de doenças autoimunes (RUULS et al., 2001; ALEXOPOULOU et al., 2006). É bem aceito que o TNFR1 pode induzir a inflamação e neurodegeneração na EM pela ativação de duas vias principais de sinalização: fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) e caspase (FISCHER; MAIER, 2015).

A ativação da via de sinalização NF- $\kappa$ B nas células endoteliais pode induzir a expressão das moléculas de adesão celular, tais como molécula de adesão das células vasculares 1 (VCAM-1) e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) contribuindo para o recrutamento de células do sistema imunológico, tais como neutrófilos, linfócitos e monócitos, os quais migrariam através da BHE para dentro dos tecidos neuronais (ZHOU; CONNELL; MACEWAN, 2007; FISCHER; MAIER, 2015). A migração transendotelial das células do sistema imunológico via BHE é um processo crítico para o desenvolvimento das doenças inflamatórias do SNC e um alvo terapêutico utilizado para o tratamento da

EM, com o anticorpo monoclonal natalizumab (ENGELHARDT; KAPPOS, 2007; SCHWAB; SCHNEIDER-HOHENDORF; WIENDL, 2015).

A ativação mediada por TNFsol pela via de sinalização NF- $\kappa$ B pode, também, induzir nas células da glia, em particular a microglia e astrócitos, a transcrição de muitos genes que promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8 e o próprio TNF- $\alpha$ , resultando potencialmente em um ciclo de amplificação da sinalização pró-inflamatória do TNF- $\alpha$  (FISCHER; MAIER, 2015; FISCHER; KONTERMANN; MAIER, 2015). TNF- $\alpha$  e seus receptores podem ser encontrados no soro, LCR e em lesões dos pacientes com EM e os níveis séricos e líquóricos são correlacionados com a atividade da doença (HAUSER et al, 1990; SHARIEF; HENTGES, 1991). Estudos prévios têm mostrado níveis elevados de TNF- $\alpha$  no soro de pacientes com EM quando comparados aos controles (ALATAB et al., 2011; KALLAUR et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018).

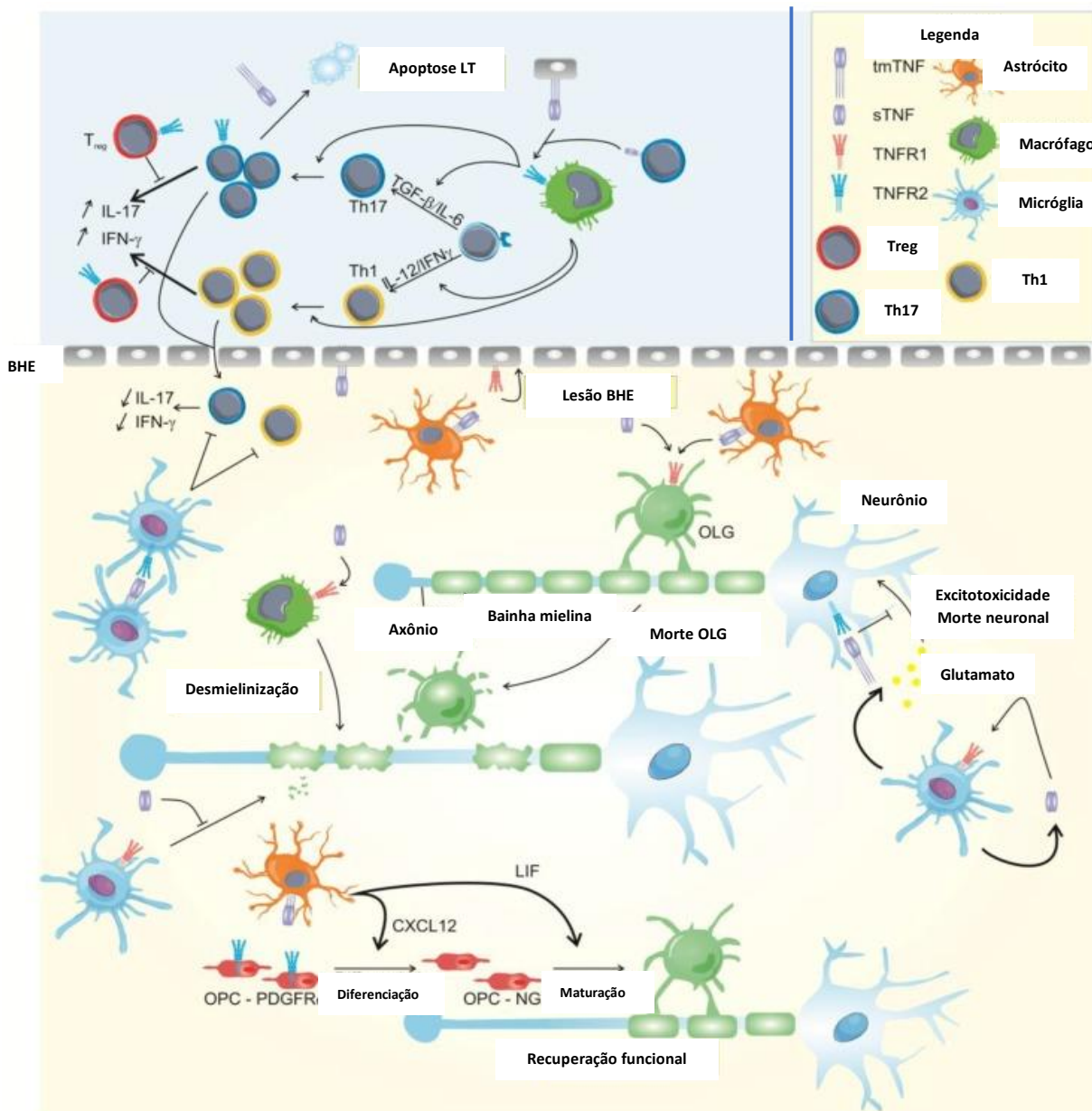
Curiosamente, *TNFRSF1A* foi validado como um gene associado à susceptibilidade à EM. A forma variante, um polimorfismo de nucleotídeo único rs1800693 no gene *TNFRSF1A*, leva à expressão de uma forma solúvel do TNFR1 que sequestra o TNF- $\alpha$  e, portanto, anula a sinalização via TNFR2. Isto sugere que a desregulação da via TNF/TNFR1 tem um papel significativo no início da EM (GREGORY et al., 2012).

A EM frequentemente apresenta déficits de memória e foi demonstrado que a sinalização TNF/TNFR1 nos astrócitos é responsável por esses distúrbios cognitivos (HABBAS, 2015). Junto aos efeitos neurodegenerativos indiretos do TNF- $\alpha$ , promovendo a neuroinflamação e o estresse oxidativo mediados pelas células da glia, estudos *in vitro* mostraram que o TNF- $\alpha$ , via TNFR1, também pode mediar a apoptose direta dos neurônios pela ativação da caspase 8 (BADIOLA et al., 2009). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  e caspase 8 ativada em modelos de lesão medular apoiam ainda mais a noção de morte celular neuronal direta mediada por TNF- $\alpha$  *in vivo* (CHEN et al., 2011).

Enquanto os efeitos pró-inflamatórios e neurodegenerativos do TNF- $\alpha$  são mediados pelo TNFsol e, portanto, pelo TNFR1, a sinalização via TNF<sub>tm</sub> que ocorre predominantemente via TNFR2 é principalmente neuroprotetora e favorece a homeostase tecidual e a regeneração (ARNETT et al., 2001). Estudos mostram que a sinalização TNF/TNFR2 pode ocorrer pelas vias de ativação PKB/AKT e NF- $\kappa$ B (PROBERT, 2015) (Figura 3).

A importância da sinalização do TNFR2 para a neuroproteção e a regeneração tecidual foi inicialmente demonstrada em ratos *TNFR2* nocautes. O papel do TNFR2 na regeneração de tecidos foi demonstrado no modelo da cuprizona de desmielinização reversível. Neste modelo, a proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos e remielinização são significativamente tardias em camundongos *TNF* e *TNFR2* nocautes, demonstrando assim que a regeneração tecidual é dependente da sinalização do TNF via TNFR2 (ARNETT et al., 2001). Alguns dos efeitos protetores e regenerativos da ativação do TNFR2 poderiam ser explicados pelo fato deste receptor promover a liberação de fatores anti-inflamatórios e neurotróficos dos astrócitos e micróglia. Em particular, os fatores derivados de astrócitos, ou seja, a quimiocina CXCL12 e o fator inibidor da leucemia (LIF), os quais promovem a diferenciação de oligodendrócitos e podem, assim, favorecer a remielinização (VERONIC et al., 2010; FISCHER et al., 2014; PATEL et al., 2012).

Em comparação com outras populações de células T, o TNFR2 é predominantemente expresso por células Treg que são importantes na regulação e supressão das funções efetoras das células Th1 e Th17. O TNFR2 é expresso especialmente em um subgrupo Treg com máximo efeito supressor (Treg FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) e a ativação do TNFR2 é importante para a proliferação e função destas células, indicando um papel importante do TNFR2 na regulação e supressão da resposta imune (FISCHER; KONTERMANN; MAIER, 2015). Por outro lado, um estudo mostrou que o TNFR2 tem função dicotômica e que o TNFR2 expresso em macrófagos e monócitos periféricos dirige a ativação imune via ativação de células T e desencadeia a transmigração de leucócitos através da BHE, enquanto o TNFR2 da micróglia fornece sinais de proteção promovendo vias anti-inflamatórias (GAO et al., 2017).



**Figura 3** Múltiplas funções para as sinalizações dos receptores 1 e 2 do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), TNFR1 e TNFR2, respectivamente, na fisiopatologia da esclerose múltipla (EM). No sistema nervoso central (SNC), o TNF- $\alpha$  é primariamente expresso por astrócitos, microglia e neurônios e pode estimular sua própria liberação via TNFR1. A sinalização TNFR1 desencadeia a morte de oligodendrócitos (OLG) e contribui para a desmielinização primária via macrófagos. Por outro lado, o TNFR2 tem efeitos protetores no SNC, pois a interação com o TNF transmembrana (TNF<sub>tm</sub>) em astrócitos estimula a remielinização e o TNFR2 neuronal protege contra a excitotoxicidade. Na periferia, o TNFR2 induz o desenvolvimento de células T efetoras; todavia, no SNC, o TNFR2 expresso na microglia é protetor. O TNF- $\alpha$ , possivelmente via TNFR2, medeia a regressão de células T ativadas específicas da mielina. Além disso, a sinalização TNFR2 também facilita a expansão das células T reguladoras (Tregs) e melhora sua

capacidade supressiva contra células T efetoras. Setas normais indicam a ação de um mediador ou os processos que são induzidos; setas em negrito representam mediadores produzidos por um subconjunto celular específico. Barras T representam a inibição da via indicada. BHE: barreira hematoencefálica; CXCL12: quimiocina CXC ligante 12; IFN- $\gamma$ : interferon gama; IL: interleucina; LIF: fator inibidor de leucemia; OPC-NG2: células progenitoras de oligodendrócitos- antígeno glia nervo 2; OPC-PDGFR $\alpha$ : unidade alfa do receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas; Th: célula T *helper*; TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta; sTNF: TNF solúvel;

Fonte: Adaptado de Steeland; Libert; Vandenbroucke (2018).

### 1.3 Diagnóstico e tratamento da EM

O diagnóstico da EM é baseado na integração de achados clínicos, de imagem e laboratoriais. No entanto, conhecimento clínico é necessário para demonstrar evidências de disseminação no tempo e no espaço e, mais importante, excluir outras condições neurológicas. A imagem de ressonância magnética nuclear (RMN) ajuda a excluir outras doenças e permite um diagnóstico mais seguro. Critérios diagnósticos conhecidos como critérios de McDonald evoluíram à medida que a tecnologia dos exames de imagem também avançou, tornando-os mais simples e mais acessíveis a uma proporção maior da população, mantendo a sensibilidade e especificidade (BROWNLEE; SWANTON; ALTMANN, 2015; POLMAN et al., 2011; THOMPSON et al., 2018a). Nos critérios de MacDonald de 2017, houve o restabelecimento do exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) para a pesquisa da presença de bandas oligoclonais e um protocolo padronizado para acompanhamento de pacientes com suspeita ou EM clinicamente definida pelo exame de RMN (THOMPSON et al., 2018b).

A EM não possui ainda um tratamento curativo, no entanto, ao longo das últimas décadas várias drogas modificadoras da doença têm sido aprovadas. A maioria destes medicamentos tem efeito anti-inflamatório; algumas drogas têm propriedades imunossupressoras, enquanto outras são direcionadas contra moléculas específicas com o emprego de anticorpos monoclonais (TORKILDSEN; MYHR; BØ, 2016; COMI; RADAELLI; SOELBERG, 2017). Com o desenvolvimento de tratamentos mais efetivos, houve também uma mudança no foco do tratamento, de redução da taxa de surtos e diminuição da progressão da incapacidade para prevenção de novas evidências da

atividade da doença (como evidenciado pela ausência de novas lesões, surtos, progressão da incapacidade e mais recentemente, atrofia tecidual) (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). Além disso, outro grande desafio tem sido a escassez de tratamento efetivo para formas progressivas da doença (MYHR et al., 2019).

A primeira droga a ser aprovada para EM remitente recorrente foi o interferon beta (IFN- $\beta$ ). Atualmente, numerosas formulações estão disponíveis para aplicação subcutânea e intramuscular, sendo que a mais recente é o IFN- $\beta$  peguilado que permite uma única dose a cada duas semanas. Embora seu modo de ação seja complexo, acredita-se que inclua a inibição da proliferação e ativação das células T, indução da apoptose das células T autoreativas, indução das células T regulatórias, modulação da produção de citocinas endógenas e inibição da migração de leucócitos através da BHE (YAMOUT; ALROUGHANI, 2018; FÖSTER et al, 2019). Os efeitos adversos mais frequentes são as reações no local da aplicação e sintomas *flu-like*, como febre, mialgia, cefaléia, fadiga e calafrios que ocorrem em até 75% dos pacientes (TORKILDSEN; MYHR; BØ, 2016).

O acetato de glatirâmer é uma composição de alanina, glutamina, lisina e tirosina que são os aminoácidos mais comuns da mielina. Pode ser aplicado pela via subcutânea diariamente ou em diferente formulação três vezes por semana. Embora o seu mecanismo de ação não seja totalmente esclarecido, parece depender da polarização da resposta Th2 a partir das células T CD4<sup>+</sup> e na modulação da atividade das células apresentadoras de antígenos (APCs) (FÖSTER et al, 2019). Geralmente é bem tolerado pelos pacientes, e o principal efeito adverso é a reação no local da aplicação (dor, eritema, inchaço e prurido) (COMI; RADAELLI; SOELBERG, 2017). Em pacientes gestantes, o acetato de glatirâmer parece ser o preferido sobre outras terapias modificadoras da doença, enquanto que em pacientes pediátricos, interferon beta e acetato de glatirâmer são aparentemente seguros e efetivos e deveriam ser selecionados como terapia de primeira linha (MARQUES et al, 2018).

Fingolimod foi a primeira terapia modificadora da doença oral aprovada para EMRR e atua como um modulador do receptor esfingosina 1 fosfato (S1P), inibindo a saída de leucócitos do linfonodo, com conseqüente redução na infiltração de linfócitos autoreativos no SNC (KAPPOS et al., 2010; COHEN et al., 2010). O principal efeito adverso do fingolimod está relacionado ao fato que os receptores S1P estão presentes em todo o corpo humano, incluindo o coração. Como resultado, pode haver indução de

bradicardia e necessidade de monitorização cardiovascular após a primeira dose ou mesmo após algumas semanas (FÖSTER et al., 2019). Dimetil fumarato é outra medicação oral aprovada para o tratamento de EMRR com atividades anti-inflamatórias e citoprotetivas. Os efeitos adversos mais comuns são sintomas gastrointestinais como diarreia, vômito e náusea (VIGLIETTA et al., 2015; BAHARNOORI et al., 2016).

A teriflunomida é um agente imunomodulador com propriedades anti-inflamatórias que inibe de forma seletiva e reversível a enzima mitocondrial diidroorotato desidrogenase (DHO-DH) com consequente inibição da proliferação das células B e T autoreativas (CLAUSSEN; KORN, 2012). Os efeitos adversos mais comuns são cefaléia, aumento das enzimas hepáticas, diarreia, queda de cabelo e náusea (O'CONNOR et al., 2011; CONFAVREUX et al., 2014; VERMERSCH et al., 2014). A cladribina foi introduzida recentemente como um tratamento para EMRR e é administrada oralmente em ciclos anuais de 8- 19 dias. Seu mecanismo de ação está relacionado à redução duradoura na contagem de linfócitos e os efeitos adversos mais frequentes são infecções e linfopenia (FÖSTER et al., 2019).

O natalizumab é um anticorpo monoclonal humanizado que reconhece  $\alpha 4$  integrinas e interrompe a sua interação com a molécula de adesão VCAM-1, resultando na diminuição da passagem dos linfócitos através da BHE (WINKELMANN et al., 2016). O efeito adverso mais importante da terapêutica com natalizumab é a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP). A LMP é uma doença desmielinizante causada pela infecção oportunista aos oligodendrócitos pelo poliomavírus JC (FÖSTER et al., 2019). Com o sucesso do natalizumab outros anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para EMRR, como o alemtuzumab. Ele atua contra o CD52, um receptor que está presente em linfócitos, monócitos e outras células imunes e não imunes (COHEN et al., 2012; COLES et al., 2012). O efeito adverso mais importante consiste de doenças autoimunes secundárias (FÖSTER et al., 2019). Natalizumab e alemtuzumab são altamente efetivos, porém, além dos graves efeitos adversos, outro fator limitante são as infusões mensais da droga (HOLMOY; VON DER LIPPE; LEEGAARD, 2017; WILLIS et al., 2016).

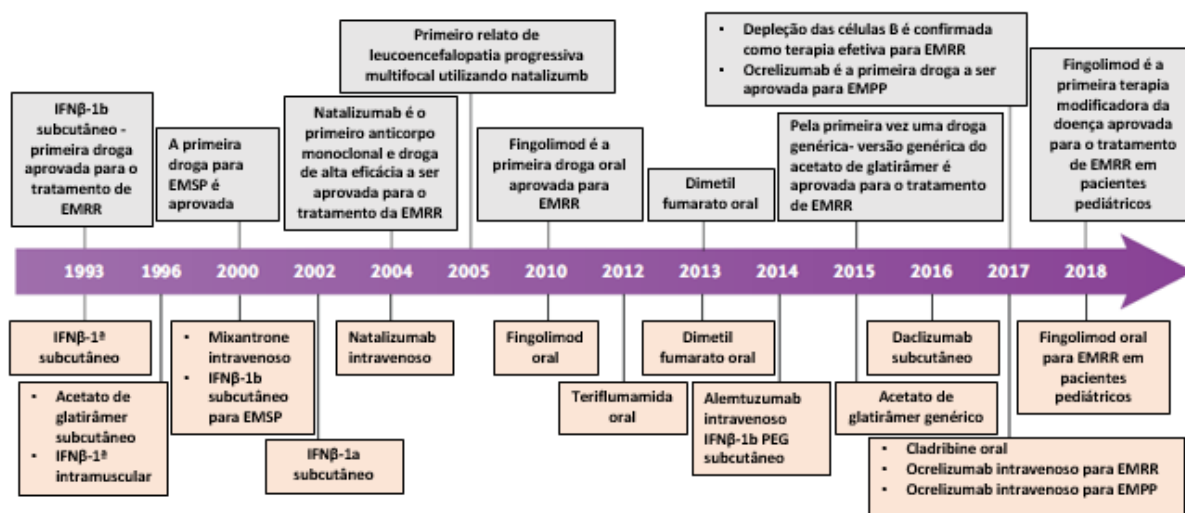
Ocrelizumab é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga seletivamente a linfócitos B que expressam o antígeno de superfície CD20. É utilizado no tratamento da EMRR e EMPP com efeitos benéficos na taxa de surtos e progressão da incapacidade. Os efeitos adversos mais importantes e mais frequentes são reações relacionadas com a

perfusão (tais como prurido, erupção cutânea e dificuldades respiratórias) e infecções (FÖSTER et al., 2019). Mixantrone é um agente antineoplásico que tem sido utilizado no tratamento da EMSP, todavia seu uso tem diminuído em anos recentes devido às altas taxas de efeitos adversos incluindo cardiotoxicidade e leucemia (YAMOUT; ALROUGHANI, 2018; FÖSTER et al., 2019). A figura 4 mostra a evolução no tratamento da EM.

De acordo com o último Consenso brasileiro para o tratamento da EM (MARQUES et al., 2018), pacientes com EMRR que apresentam níveis leves ou moderados de atividade da doença (ocorrência de surtos ou aumento/novas lesões verificadas por RMN) poderiam iniciar o tratamento utilizando drogas com um bom perfil de segurança e mais facilmente acessíveis, como acetato de glatirâmer, dimetil fumarato, interferon- $\beta$  em suas várias formulações ou teriflunamida. Por outro lado, em casos de EMRR altamente ativas ou com fatores associados a um pior prognóstico, deveria se considerar o uso de drogas mais potentes como alemtuzumab, cladribina, fingolimode, natalizumab e ocrelizumab.

No passado, os bloqueadores de TNF- $\alpha$  demonstraram sua eficácia no tratamento de várias doenças autoimunes, tais como artrite reumatoide e psoríase. No entanto, o desenvolvimento de efeitos adversos graves durante a inibição do TNF- $\alpha$  de longa duração revelou riscos associados ao bloqueio completo do TNF- $\alpha$ . Além disso, a inibição total do TNF- $\alpha$  tem sido prejudicial para o tratamento de várias doenças em que esta citocina foi implicada, como a EM. Enquanto alguns dos efeitos adversos descritos são devidos à inibição do TNF- $\alpha$ , por exemplo, o aumento do risco de infecções, muitos dos efeitos adversos são, provavelmente, devido ao papel do TNF- $\alpha$  na regulação da resposta imune e regeneração tecidual (FISCHER; KONTERMANN; MAIER, 2015).

Uma estratégia terapêutica ideal para doenças autoimunes, como a EM, seria bloquear seletivamente o sinal TNFsol/TNFR1 pela administração de inibidores de TNFsol, ou usando antagonistas TNFR1, mantendo intacta a via de sinalização do TNFR2. Outra estratégia promissora seria utilização de agonistas do TNFR2 que poderiam impulsionar a expansão de Treg e promover a regeneração tecidual. O desenho dessas estratégias terapêuticas visando as vias de sinalização TNFR1 ou TNFR2 mantém a promessa para o tratamento de diversas doenças inflamatórias e neurodegenerativas, como a EM (YANG et al., 2018).



**Figura 4** Linha do tempo do desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da esclerose múltipla (EM). Importantes marcos do desenvolvimento são mostrados nos quadros de cor cinza e drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (Estados Unidos) ou Agência Europeia de Medicina para o tratamento de EM secundária progressiva são mostradas nos quadros de cor rosa.

Fonte: Adaptado de Tintore; Vidal-Jordana; Sastre-Garriga (2019).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os dados na literatura sobre a associação entre TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2 com características clínicas e laboratoriais da EM, realizados em populações mundiais com diferentes características geográficas, climáticas e étnicas, são conflitantes. Tendo em vista a complexidade da EM e a participação crítica do TNF- $\alpha$  e seus receptores, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade, incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas da doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2 e sua possível associação com incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas da doença em pacientes com EM.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Comparar os níveis plasmáticos do TNF- $\alpha$  e dos receptores sTNFR1 e sTNFR2 em pacientes com EM e indivíduos saudáveis;
- Avaliar a associação entre TNF- $\alpha$ , sTNFR1, sTNFR2 e a incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas em pacientes com EM;
- Propor modelos preditores para diagnóstico de EM, da incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas, da EM utilizando os biomarcadores TNF- $\alpha$ , sTNFR1, sTNFR2.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, com o Parecer de Aprovação no. 159/10, CAAE no. 22290913.9.0000.5231, em 30 de agosto de 2010 (ANEXO A). Todos os indivíduos foram convidados a participarem voluntariamente da pesquisa, informados, em detalhes, sobre o estudo a ser desenvolvido e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNCIDE A).

### **4.2 Delineamento**

Foi realizado um estudo observacional, caso-controle prospectivo para atingir os objetivos descritos neste trabalho.

### **4.3 Amostra**

Os pacientes com EM foram convidados a participarem do estudo ao se apresentarem para consulta no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. A amostra foi obtida por conveniência de tempo e local. Foram avaliados 168 pacientes com EM de ambos os sexos, com idade entre 18 a 70 anos, diagnosticados segundo os critérios de McDonald (POLMAN et al., 2011) e classificados como EMRR (n=147), EMSP (n=17) e EMPP (n=4). O grupo controle foi composto de 70 indivíduos saudáveis, adultos, ambos os sexos, selecionados, consecutivamente, entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina e da população geral. Os indivíduos avaliados deste grupo não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renal, cardíaca ou hepática e reportaram não fazerem uso de medicamentos anti-inflamatórios e suplementos antioxidantes.

O grau de incapacidade dos pacientes foi avaliado por meio do EDSS, com escores que variaram de 0,0 a 10,0 (KURTZKE, 1983). Os pacientes foram categorizados com incapacidade leve ( $EDSS < 3,0$ ) e moderada /grave ( $EDSS \geq 3,0$ ) (KALLAUR et al. 2017). Para avaliar a progressão da incapacidade, utilizou-se a escala MSSS, de acordo com o método proposto por Roxburgh et al. (2005), e escore  $\geq 5,0$  foi considerado progressão mais rápida de incapacidade (KOCH et al. 2015). Para calcular o MSSS de cada paciente,

utilizou-se o EDSS e o tempo de diagnóstico da doença; desta forma, observou-se a rapidez da progressão da incapacidade (ROXBURGH et al., 2005).

Todos os indivíduos envolvidos neste estudo relataram não fazer uso de bebidas alcoólicas regularmente e não praticavam exercício físico regularmente.

#### **4.4 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os pacientes com diagnóstico de outras doenças autoimunes, entre elas a neuromielite óptica, com doenças infecciosas e outras comorbidades e os que faziam uso de qualquer suplemento vitamínico e/ou antioxidante que poderiam influenciar nos biomarcadores avaliados.

#### **4.5 Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos**

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo, etnia), epidemiológicos (hábitos de vida como tabagismo), antropométricos [peso, altura e índice de massa corporal (IMC)] e clínicos (formas clínicas, EDSS e terapia para EM) dos indivíduos inseridos no estudo. Os dados foram coletados pela aplicação de um questionário padrão (Apêndice B), respondidos pelos pacientes ou seus responsáveis e pelos indivíduos do grupo controle. A etnia foi classificada de acordo com a autopercepção do indivíduo da cor da sua pele como caucasiano e não caucasiano (BRASIL, 2011). Os dados foram, também, obtidos por meio de consulta aos prontuários médicos e à base de dados LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL. As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (Kg) e altura (m), obtidas por interrogatório durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em  $\text{kg/m}^2$ .

A síndrome metabólica (SM) foi diagnosticada quando o indivíduo apresentou a combinação de, pelo menos, três componentes dos seguintes critérios: obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal em homens  $> 94$  cm e em mulheres  $> 80$  cm; triglicerídeos  $\geq 150$  mg/dL; lipoproteína de alta densidade (HDL)-colesterol em homens  $< 40$  mg/dL e em mulheres  $< 50$  mg/dL; pressão arterial sistólica (PAS)  $\geq 130$  mmHg ou pressão arterial diastólica (PAD)  $\geq 85$  mmHg ou uso de medicamentos anti-hipertensivos e glicemia de jejum  $\geq 100$  mg/dL (GRUNDY et al, 2005).

#### 4.6 Coleta de Material Biológico

Para análise dos marcadores laboratoriais, a coleta de sangue periférico, com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e sem anticoagulante, foi realizada após um período de 12 horas de jejum. O material foi encaminhado imediatamente ao laboratório para registro, processamento e armazenamento das amostras. O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas de plasma e soro foram armazenadas no *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso. Todos os pacientes e controles, bem como suas respectivas amostras, foram identificados por número e letra para garantir o anonimato e confidencialidade dos indivíduos e dos resultados obtidos.

#### 4.7 Marcadores Inflamatórios

Os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ , sTNFR1, sTNFR2 foram determinados por reagente customizados de imunofluorimetria utilizando multiplex (Novex Life Technologies, Frederick, MD, USA) para plataforma Luminex<sup>®</sup> (MAGPIX<sup>®</sup>, Luminex Corp, Austin, TX, USA).

#### 4.8 Análise Estatística

As análises das tabelas de contingência (teste do  $\chi^2$ ) foram empregadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e os grupos diagnósticos. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição. A transformação logarítmica (Ln) dos dados contínuos foi utilizada na análise quando as variáveis não estavam normalmente distribuídas ou quando não havia heterogeneidade de variância avaliada com o teste de Levene. Foram avaliadas as diferenças nas variáveis contínuas entre os grupos usando análises de variância (ANOVA). As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e as variáveis contínuas foram expressas como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). As correlações entre o TNF- $\alpha$ , o sTNFR1 e o sTNFR2 e as citocinas foram avaliadas usando os coeficientes de correlação de Spearman. Os modelos lineares generalizados (GLM) foram empregados para avaliar os efeitos multivariados das variáveis explicativas (incluindo o diagnóstico) nas variáveis dependentes (TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2) enquanto controlavam sexo, idade, etnia e IMC. Testes para efeitos entre indivíduos foram empregados para avaliar os efeitos univariados de variáveis preditoras significativas nas variáveis dependentes. O teste M de Box foi utilizado para testar a homogeneidade de covariância das matrizes.

A associação entre TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2 e EM foi avaliada usando análise de regressão logística binária automática *stepwise* controlada por covariáveis (sexo, idade, etnia e IMC) que poderiam confundir a associação de interesse. Quatro modelos diferentes de análises de regressão logística binária automática *stepwise* foram empregados para delinear o TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2 e as variáveis mais significativas que estão associadas com EDSS (<3,0 *versus*  $\geq$ 3,0), formas clínicas (EMRR e formas clínicas progressivas) e progressão da incapacidade (MSSS <5,0 *versus* MSSS  $\geq$ 5,0). Os valores de sTNFR1 e sTNFR2 também foram transformados em escore z para calcular uma nova pontuação composta refletindo a relação sTNFR1 / sTNFR2, ou seja, z Ln sTNFR1 – z Ln sTNFR2. A análise também incluiu *odds ratio* (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% avaliados usando os escores z. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa IBM SPSS, versão do Windows 25. Os testes foram bicaudais e um valor de  $P < 0,05$  indicou resultados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico original com o título **“Tumor necrosis factor  $\alpha$  and its soluble receptors are associated with disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis”**, foi submetido à *Multiple Sclerosis Journal*.

**TUMOR NECROSIS FACTOR (TNF- $\alpha$ ) AND ITS SOLUBLE RECEPTORS ARE ASSOCIATED WITH DISABILITY, DISABILITY PROGRESSION AND CLINICAL FORMS OF MULTIPLE SCLEROSIS**

Claudia Mara Ribeiro<sup>1</sup>, Sayonara Rangel Oliveira<sup>1,2</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Damacio Ramón Kaimen-Maciel<sup>3</sup>, Andréa Name Colado Simão<sup>1,2</sup>, Michael Maes<sup>4,5</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Applied Immunology; Health Sciences Center, University of Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>2</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University of Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>3</sup>Hospital Santa Casa de Misericórdia de Londrina; Londrina, Brazil.

<sup>4</sup>IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

<sup>5</sup>Department of Psychiatry, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Chulalongkorn, Bangkok, Thailand

**Corresponding author:** Edna Maria Vissoci Reiche, Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, University Hospital, State University of Londrina, Av. Robert Koch 60, Vila Operária, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil; E-mail: reiche@sercomtel.com.br, Tel: 55 (43) 33712321; Fax: +55-43- 3371-2619; ORCID: 0000-0001-6507-2839

**Abstract**

**Background:** The association between tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , soluble TNF receptor (sTNFR)1 and sTNFR2 with clinical characteristics of multiple sclerosis (MS) remains unclear.

**Objective:** To examine whether TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 are associated with MS diagnosis, disability, disability progression and clinical forms of MS.

**Methods:** The study included 147 patients with relapsing-remitting MS (RRMS), 21 with progressive clinical forms (ProgMS) and 70 controls. Expanded Disability Status Scale (EDSS) evaluated disability as mild (EDSS<3.0) or moderate/high (EDSS $\geq$ 3.0). Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) evaluated disability progression as no progression (MSSS<5) and progression (MSSS $\geq$ 5). Baseline data of subjects MS and plasma levels of TNF- $\alpha$ , sTNFR1, sTNFR2 were obtained.

**Results:** The MS diagnosis explained 44.6% and 12.3% of TNF- $\alpha$  and sTNFR2 levels, respectively. Moderate/high disability and disability progression were best predicted by sTNFR1 and age (positively) and ProgMS were best predicted by sTNFR1 (positively) and sTNFR2 (negatively), coupled with age and sex. A composite score reflecting the sTNFR1/sTNFR2 ratio showed a positive association with ProgMS after adjusting for age and sex.

**Conclusion:** sTNFR1 and age were positively associated with disability and disability progression whereas sTNFR1 (positively) and sTNFR2 (negatively) were associated with ProgMS, suggesting a distinct role of them in the immunopathological mechanisms of MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis; tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ; sTNFR1, sTNFR2; disability; MSSS

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating immune-mediated disease, which affects the central nervous system (CNS). The etiology is multifactorial with a complex interrelation between genetic, epigenetic, hormonal, immunological, and environmental factors. Further, accumulating evidence suggests that the autoimmune inflammation in early MS is primarily mediated by an adaptive immune response and involves autoreactive T *helper* (Th)1, Th17, and B cells, as well as autoantibodies with reactivity against epitopes of the myelin proteins. However, the later chronic stages of the disease are characterized by a compartmentalized innate immune response in the CNS with activated microglia and macrophages.<sup>1</sup>

Different mechanisms may explain the heterogeneity of MS regarding the clinical symptoms, clinical forms, disability, disability progression and therapeutic response presented by the affected patients. Cytokines and their receptors are among the possible mediators of this heterogeneity.<sup>1</sup> High levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  were found in blood samples of MS patients as compared with controls<sup>2,3</sup> and in cerebrospinal fluid of the patients with chronic progressive clinical forms of MS (ProgMS), suggesting that TNF- $\alpha$  could be associated with the diagnosis of MS as well as the progression of the disease over time.<sup>4,5</sup> A previous study demonstrated that patients with ProgMS with disease progression presented higher levels of TNF- $\alpha$  than those with ProgMS but without disease progression.<sup>6</sup>

TNF- $\alpha$  and the soluble forms of its receptors (sTNFR)1 and sTNFR2 also have been investigated in the MS.<sup>7</sup> A dual role of TNF- $\alpha$  in the CNS has been revealed. In many cases, neuroprotective activity has been associated with TNFR2, whereas TNFR1, directly and indirectly, promotes neurotoxicity, inflammation and cell death.<sup>2,8</sup> One study reported increased serum levels of sTNFR2 in patients with primary progressive MS (PPMS) compared with other clinical forms of MS and healthy controls.<sup>9</sup>

Immunobiologicals targeting the TNF- $\alpha$  are extremely successful in treating a number of immune mediated diseases; however, clinical trials using anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibodies as therapy in MS patients resulted in disease exacerbation.<sup>10</sup> It is hypothesized that these paradoxical effects of anti-TNF- $\alpha$  are due to inhibition of TNFR2 signaling.<sup>11</sup>

To our knowledge, the association between TNF- $\alpha$  and sTNFR1 and sTNFR2 with clinical characteristics of MS patients remains unclear. Thus, the aim of study was to verify whether TNF- $\alpha$  and its soluble receptors are associated with MS diagnosis, disability, disability progression and clinical forms of MS.

## **Methods**

### *Subject characteristics*

The study included 168 patients with MS enrolled from the Neurology Outpatient of the University Hospital, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. The diagnosis of MS was defined according to the McDonald criteria.<sup>12</sup> Relapsing-remitting MS (RRMS) was diagnosed in 147 (87.5%) patients and progressive clinical forms in 21 (12.5%), including 4 (2.4%) with primary progressive MS (PPMS) and 17 (10.1%) with secondary progressive MS (SPMS). At the baseline visit, the disability was evaluated using the Expanded Disability Status Scale (EDSS),<sup>13</sup> and the patients were divided into those with mild disability (EDSS < 3.0) or moderate/high disability (EDSS  $\geq$  3.0).<sup>5</sup> To assess the disease progression, we used the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), as proposed elsewhere<sup>14</sup> and score  $\geq$  5.0 denoted higher than average speed of disability accumulation.<sup>15</sup> As controls, 70 healthy individuals were selected among blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, from the same geographic region of the patients. None of the participants in the study presented clinical symptoms or laboratory markers of heart, thyroid, kidney, hepatic, gastrointestinal, or oncologic diseases.

Demographic, epidemiological and anthropometric data (patients and controls), as well as clinical history and the use of therapy for MS before the inclusion in this study (for patients) were obtained using a standard questionnaire at the admission of the individuals, as previously described.<sup>3</sup> Briefly, body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared and the ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian. Tabagism was considered when the individuals were current smokers. Systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured and the mean of two measurements was used in the analysis

as described elsewhere.<sup>3</sup> Use of antihypertensive medication was an indication of systemic arterial hypertension (SAH).<sup>16</sup> Diabetes mellitus type 2 (DM) was defined as a fasting serum glucose  $\geq 126$  mg/dL, a non-fasting serum glucose  $\geq 200$  mg/dL and/or use of hypoglycemic medication.<sup>17</sup> Dyslipidemia and metabolic syndrome (MetS) were defined as previously reported.<sup>18</sup>

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 22290913.9.0000.5231) and all of the individuals invited were informed in detail about the research and gave written informed consent.

#### *Laboratory biomarkers*

Venous blood samples were drawn under fasting state, with and without anticoagulant at admission. Plasma and serum were separated through centrifugation (2,500 rpm for 15 min) and aliquots were stored at  $-80$  °C until analysis. A panel of TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 were determined using customized immunofluorimetric assay (Novex Life Technologies, Frederick, USA) for the Luminex® platform in MAGPIX instrument.

#### *Statistical Analysis*

Analyses of contingency tables ( $\chi^2$  test) were employed to check the associations between categorical variables and diagnostic groups. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformation of continuous data was used in the analysis when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance as assessed with the Levene test. We assessed the differences in continuous variables between groups using analyses of variance (ANOVA). Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as mean  $\pm$  error standard of main (SEM). The correlations between TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 were assessed using Spearman correlation coefficients. Multivariate general linear model (GLM) analysis was used to assess the effects of explanatory variables (including diagnosis) on dependent variables (TNF- $\alpha$ , sTNFR1, and sTNFR2) while controlling for sex, age, ethnicity, and BMI. Tests for

between-subject effects were employed to assess the univariate effects of significant predictor variables on the dependent variables. Box's M statistic was used to test for homogeneity of covariance matrices.

The association between TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 and MS was evaluated using automatic stepwise binary logistic regression analysis controlled for covariates that may confound the association of interest. Four different models of automatic stepwise binary logistic regressions analysis were employed to delineate TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 and the most significant variables that are associated with disability (EDSS<3 *versus*  $\geq 3$ ), disability progression (MSSS<5 *versus* MSSS $\geq 5$ ) and clinical forms (RRMS *versus* ProgMS). The values of sTNFR1 and sTNFR2 were also transformed as z score and a composite score reflecting the sTNFR1/sTNFR2 ratio (namely  $z \ln sTNFR1 - z \ln sTNFR2$ ), was computed. The analysis also included the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) evaluated using the z scores. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 25. Tests were 2-tailed and an alpha level of 0.05 indicated statistically significant results.

## Results

### *Characteristics of the subjects*

The mean age at MS diagnosis and disease duration were 34.6 years ( $\pm 0.85$ ) and 7.8 years ( $\pm 0.54$ ), respectively; 87 (55.1%) patients presented moderate/high disability (EDSS $\geq 3$ ) and 71 (44.9%) patients presented mild disability (EDSS<3). When the disability progression was evaluated, 79 (54.9%) patients showed progression and 65 (45.1%) showed no progression. According to the MS therapy, 14 (8.4%) patients were without treatment, 96 (57.5%) were treated with interferon  $\beta$ , 46 (27.5%) were treated with glatiramer acetate, 10 (6.0%) were using natalizumab and 1 (0.6%) was using fingolimod (data not shown).

Table 1 shows the baseline data of the MS patients and controls. We did not use p-corrections to interpret the multiple results of univariate tests presented in Table 1 as these results were used to delineate the most significant predictor variables to be used as independent explanatory variables in the binary logistic regression analyses. MS patients did not differ in the

variables age, sex, ethnicity, BMI, smoking, SAH, the presence of MetS and the levels of sTNFR1 when compared to controls ( $p>0.05$ ). MS patients showed higher levels of TNF- $\alpha$ , sTNFR2 than controls. It should be stressed that these biomarker results were not adjusted for possible extraneous variables including age, sex, BMI, and ethnicity. As shown in Figure 1, patients with moderate/high disability showed higher levels of TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 than those with mild disability ( $P=0.029$ ,  $P=0.002$  and  $P=0.019$ , respectively). Moreover, patients with disability progression showed higher levels of sTNFR1 and sTNFR2 than those with no disability progression ( $P<0.001$  and  $P=0.005$ , respectively), but only patients with ProgMS showed higher levels of sTNFR1 when compared to those with RRMS ( $P=0.038$ ).

#### *Associations with MS diagnosis*

Table 2 shows the results of a multivariate GLM analysis with TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 as dependent variables and diagnosis as the primary explanatory variable while adjusting for age, sex, BMI, and ethnicity. We found that MS diagnosis, age, and BMI had significant effects on the levels of TNF- $\alpha$  and its receptors, whereas sex and ethnicity did not. Tests for between-subject effects showed that MS diagnosis was positively associated with TNF- $\alpha$  with an effect size of 44.6% and sTNFR2 with an effects size of 12.3%. BMI showed a modest positive effect on both sTNFR1 and sTNFR2, and age was positively associated with sTNFR2. The GLM model showed equivalence of covariance matrices ( $P=0.066$ ) and the dependent variables presented equal variances ( $P>0.05$ ). In Table 3, we showed the estimated marginal means values (in z scores) of TNF- $\alpha$ , as well as sTNFR1 and sTNFR2 in MS patients and controls. TNF- $\alpha$  and sTNFR2 were significantly higher in patients with MS than controls, while sTNFR1 did not differ from controls.

Multivariate GLM analysis showed that there were no significant effects of SAH ( $F=0.98$ ,  $df=3/184$ ,  $P=0.403$ ,  $n=35$ ), smoking ( $F=0.32$ ,  $df=3/185$ ,  $P=0.296$ ,  $n=21$ ), DM ( $F=0.24$ ,  $df=3/182$ ,  $P=0.866$ ,  $n=12$ ), MetS ( $F=1.22$ ,  $df=3/184$ ,  $P=0.302$ ,  $n=46$ ), and the drug state of the patients ( $F=1.51$ ,  $df=12/471$ ,  $P=0.117$ ) on the three TNF data (data not shown).

In order to delineate the best biomarkers associated with MS we have carried out different hierarchical logistic regression analyses. We found that TNF- $\alpha$  is the single best predictor of MS

diagnosis ( $\chi^2=107.18$ ,  $df=1$ ,  $P<0.001$ , Nagelkerke=0.742) with an Odds ratio of 20.10 and 95% confidence intervals of 12.98-193.30 (lower and upper limit); 96.9% of all subjects were correctly classified with a sensitivity of 100% and a specificity of 79.3% (data not shown).

*Associations with disability, progression of disease and clinical forms of MS*

In order to delineate the best biomarkers associated with the disability (EDSS $\geq$ 3 *versus* EDSS<3), disability progression (MSSS $\geq$ 5 *versus* MSSS<5) and clinical forms (RRMS *versus* ProgMS) we have carried out different automatic stepwise regression analyses with disability, progression and clinical subtypes as dependent variables. Table 4, regression #1 shows that EDSS $\geq$ 3 was best predicted by sTNFR1 and age (both positively), while TNF- $\alpha$  and sTNFR2 had no significant effects. With this model, 73.6% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 74.6% and a specificity of 73.8% ( $R^2$  Nagelkerke=0.262,  $\chi^2=34.37$ ,  $df=2$ ,  $P<0.001$ ). Entering drug state, BMI, smoking, HAS, ethnicity, DB and MetS showed that these variables were not significant predicting EDSS  $\geq$ 3 (data not shown).

Logistic regression #2 shows that MSSS $\geq$ 5 was best predicted by sTNFR1 and age (both positively) and that TNF- $\alpha$  and sTNFR2 have no significant effects. With this model, 66.0% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 58.5% and specificity of 72.2%, ( $R^2$  Nagelkerke=0.170,  $\chi^2=19.62$ ,  $df=2$ ,  $P<0.001$ ). Entering drug state, BMI, smoking, HAS, DM, ethnicity and MetS showed that smoking was a significant predictor ( $F=5.69$ ,  $df=1$ ,  $P=0.017$ ) and that the effects of sTNFR1 remained significant ( $F=8.18$ ,  $df=1$ ,  $P=0.004$ ) (data not shown).

Regression #3 shows that the ProgMS was best predicted by sTNFR1 (positively) and sTNFR2 (negatively), coupled with age and sex. With this model, 86.9% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 66.7% and specificity of 89.8%, ( $R^2$  Nagelkerke=0.285,  $\chi^2=27.43$ ,  $df=4$ ,  $P<0.001$ ). Consequently, we have computed a score reflecting the sTNFR1/sTNFR2 ratio. Table 4 regression #4 shows that ProgMS was significantly and positively associated with this ratio after adjusting for age and sex. With this model, 86.3% of all cases were correctly classified with a sensitivity of 66.7% and specificity of 89.1%, ( $R^2$  Nagelkerke=0.285,  $\chi^2=27.43$ ,  $df=3$ ,  $p<0.001$ ). Moreover, 1000 bootstraps showed that the composed score  $z\text{Ln sTNFR1}-z\text{Ln sTNFR2}$  had a

significant effect ( $P=0.019$ ) with a B value of 0.693, bias of 0.066 and standard error (SE) of 0.354 (95% CI 0.180-1.526). Entering drug state, BMI, smoking, HAS, DM, ethnicity and MetS, the analysis showed that BMI had a protective effect on the ProgMS ( $F=4.81$ ,  $df=1$ ,  $P=0.028$ ) and that the effects of  $zLn$  sTNFR1- $zLn$  sTNFR2 remained significant ( $F=6.37$ ,  $df=1$ ,  $P=0.012$ ).

## Discussion

The main findings of the present study are that increased TNF- $\alpha$  and sTNFR2 levels are associated with MS, as well as increased levels of sTNFR1 coupled with age are positively associated with moderate/high disability and disability progression. Moreover, increased sTNFR1 levels combined with lower sTNFR2 levels, increasing age and male sex increase risk towards the ProgMS, suggesting that high levels of sTNFR1 may be a risk factor while high levels of sTNFR2 may exert a protective role modulating the immunopathological mechanisms of MS. As such, a newly proposed score reflecting the sTNFR1/sTNFR2 ratio could be an important biomarker to evaluate the development of the ProgMS.

Our results also demonstrated that the MS diagnosis can exert a strong effect of 44.6% in the levels of TNF- $\alpha$ . The higher levels of TNF- $\alpha$  observed in the present cohort of MS patients compared to controls are consistent with previous studies,<sup>2,6,19</sup> as well as regarding to sTNFR1 and sTNFR2.<sup>3</sup> TNF- $\alpha$  is considered the principal mediator of inflammatory response and is increased in CSF and peripheral mononuclear cells during relapses of MS suggesting that this cytokine exerts an important effect in the pathogenesis and progression of the disease.<sup>1</sup>

The higher levels of sTNFR2 observed in MS patients of the present study, as well as its association with the MS diagnosis show the vital role of this receptor in the modulation of the immune response, most likely through its interactions with T regulatory cells (Tregs).<sup>20</sup> The relevance of TNFR2 signaling for neuroprotection and tissue regeneration was initially showed in TNF- $\alpha$  and TNFR2 knockout mice that showed delayed proliferation of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) and demyelination, demonstrating that tissue regeneration is dependent on the signaling of TNF- $\alpha$  *via* TNFR2.<sup>21</sup> In this way, our results suggest that sTNFR1 and sTNFR2 could contribute to the development of ProgMS; while sTNFR1 may act as a harmful factor for neurodegeneration, sTNFR2 may act as a protective factor involved in the remyelination.<sup>21</sup>

Using binary logistic regression analysis to predict the models for high disability in MS patients, we observed that older patients with higher levels of sTNFR1 showed increased moderate/severe disability, as well as more disability progression than younger participants with lower levels of sTNFR1. These results underscore age as one independent factor for disability and disability progression.<sup>22-24</sup> The positive association between sTNFR1 with increased disability in MS patient is in agreement with previous, as well as with ProgMS,<sup>9</sup> suggesting that TNF- $\alpha$  could be signaling via sTNFR1. These results could be explained by the fact that sTNFR1 can exacerbate neurodegeneration mediated by activation of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in endothelial cells and can induce the expression of cell adhesion molecules thereby promoting the transmigration of immune cells into the CNS parenchyma.<sup>25</sup> Moreover, in glial cells, in particular microglia and astrocytes, enhanced sTNFR1 signaling will thus greatly enhance the inflammatory response thereby promoting neurodegeneration.<sup>21,26</sup> TNF- $\alpha$ , via sTNFR1, can also *in vitro* mediate direct apoptosis of neurons by activation of caspase 8<sup>27</sup> and elevated levels of TNF- $\alpha$  and activated caspase 8 in spinal cord injury models further support the notion of TNF- $\alpha$  mediated direct neuronal cell death *in vivo*.<sup>28</sup> In this way, our results support the hypothesis that sTNFR1 is a factor that is more associated with disability progression in MS patients and that therapy targeting this receptor could be useful for the treatment of them.<sup>11</sup>

The positive associations between sTNFR1 levels and disability, disability progression and ProgMS, as well as the negative association between sTNFR2 and ProgMS, may underscore the key role of these molecules in the immune- inflammatory pathophysiology of MS.<sup>29,30,5</sup> Although sTNFR1 and sTNFR2 are strongly correlated with each other, they have distinct roles in immune responses, apoptosis, and inflammatory renal injury.<sup>31,32</sup> TNFR2 is expressed on cells within specific lymphocyte populations, including Treg cells<sup>7</sup> and has an important role in apoptotic cell death and in thymocyte and cytotoxic T cell proliferation.<sup>33,34</sup> When the TNFR2 signaling pathway is activated, it increases Treg stability, expansion and function. Under inflammatory conditions, the membrane TNFR2 can be shed into the plasma (where the receptor is measurable as the sTNFR2) thereby attenuating TNF- $\alpha$  signaling.<sup>20</sup>

Furthermore, the results of the present study showed that age and sTNFR1 were the best predictors of ProgMS, suggesting that sTNFR2 may exert a protective role in these clinical forms. We also showed that age was associated with the ProgMS, while male sex was positively associated with this condition. Although men have a lower risk of developing MS than women, previous studies have suggested that male sex is a risk factor for a progressive onset of the disease, poor recovery after initial attacks, more rapid accrual of disability and an overall more malignant course. Conversely, females are more likely to manifest benign MS outcome.<sup>35,36</sup>

ProgMS is characterized clinically by the accumulation of neurological disability, independent of relapses, and can present as the initial disease course (PPMS) or more commonly after an initial relapsing phase of the disease (SPMS).<sup>37</sup> Degeneration of chronically demyelinated axons is a prominent feature of the progressive MS brain and a major cause of irreversible neurological disability, besides the damage or dysfunction of astrocytes and microglia activation.<sup>38,39</sup> Whereas the proinflammatory and neurodegenerative effects of TNF- $\alpha$  are primarily mediated by soluble TNF- $\alpha$  and thus by TNFR1, signaling via membrane TNF, predominantly via TNFR2, is mainly neuroprotective and supports tissue homeostasis and regeneration.<sup>21</sup>

The present results should be discussed taking into account some limitations. First, the cross-sectional design of the study does not allow to make causal inferences. Second, the sample size of patients with ProgMS was rather modest. However, the study used the MSSS scale, which is currently the best available rating scale to measure speed of disability accumulation in MS.<sup>40,41</sup>

To our knowledge, the present study is the first to evaluate the association between TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 with disability, disability progression, and clinical forms of MS. Taken together, our results support the hypothesis of the distinct role of TNF- $\alpha$  and its receptors in the immunopathogenesis of MS, with a clear evidence of a neurodegenerative role of sTNFR1 in the disability, disability progression, and clinical forms, while high levels of sTNFR2 associated with the presence of MS, as well as with ProgMS, may be a compensatory and protective response to modulate the immunopathological mechanisms involved in the disease. These results also suggest that the specific blockage of TNFR1 could be a possible therapy approach for the treatment of patients with MS, mainly those with ProgMS who do not respond to the current therapies.

## **Acknowledgements**

The study was supported by grants from the Coordination for the Improvement of Higher Level of Education Personnel (CAPES) of Brazilian Ministry of Education; Institutional Program for Scientific Initiation Scholarship (PIBIC) of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); and State University of Londrina (PROPPG). We thank the University Hospital of State University of Londrina for technical supports.

## **Conflicts of interest**

The authors declare that they have no competing interests.

## **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

## **Informed consent**

All the participants included in this study provided written informed consent.

## **References**

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 2016; 36: 115-127.
2. Probert L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 2015; 302: 2-22.
3. Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis* 2018; 33: 1393-1399.
4. Sharief MK, Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1991; 325: 467-472.

5. Kallaur AP, Reiche EM, Oliveira SR, et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 2017a; 54: 31-44.
6. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, et al. Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. *Mol Neurobiol* 2017b; 54: 2950-2960.
7. Pegoretti V, Baron W, Laman JD, et al. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Front Immunol* 2018; 9: 925.
8. McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflamm* 2008; 17: 5–45.
9. Fissolo N, Cantó E, Vidal-Jordana A, et al. Levels of soluble TNF-RII are increased in serum of patients with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 271: 56-59.
10. van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, et al. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 1996; 47: 1531–1534.
11. Tseng WY, Huang YS, Lin HH, et al. TNFR signalling and its clinical implications. *Cytokine* 2018; 101: 19–25. doi.org/10.1016/j.cyto.2016.08.027.
12. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69: 292-302.

13. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33: 1444–1452.
14. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; 64: 1144-1151.
15. Koch MW, George S, Wall W, et al. Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2015; 350: 46–50.
16. James PA, Oparil S, Carter BL, et al. 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311: 507–520.
17. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* 2014; 37 Suppl 1: S14-80.
18. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005; 112: 2735–2752.
19. Alatab S, Maghbooli Z, Hossein-Nezhad A, et al. Cytokine profile, Foxp3 and nuclear factor- $\kappa$ B ligand levels in multiple sclerosis subtypes. *Minerva Med* 2011; 102: 461-468.
20. Yang S, Wang J, Brand DD, et al. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Front Immunol* 2018; 9:784. doi: 10.3389/fimmu.2018.00784.

21. Fischer R, Maier O Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 610813
22. Trojano M, Liguori M, Bosco Zimatore G, et al. Age-related disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2002; 51: 475–480.
23. Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, et al. Age and disability accumulation in multiple sclerosis. *Neurology* 2011; 77: 1246–1252.
24. Tomassini V, Fanelli F, Prosperini L, et al. Predicting the profile of increasing disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2018; 1352458518790397.
25. Zhou Z, Connell MC, MacEwan DJ. TNFR1-induced NF- $\kappa$ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. *Cellular Signaling* 2007; 19: 1238–1248.
26. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF- $\kappa$ B pathway. *FEBS J* 2011; 278: 862–876.
27. Badiola N, Malagelada C, Llecha N, et al. Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. *Neurobiology of Disease* 2009; 35: 438–447.
28. Chen KB, Uchida K, Nakajima H, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine* 2011; 36: 1350–1358.

29. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ (2005) Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 106:163–177
30. Graber JJ, Ford D, Zhan M, et al. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlation with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 2007; 185: 168-174.
31. Vielhauer V, Mayadas TN. Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Semin Nephrol* 2007; 27: 286–308.
32. Speeckaert MM, Speeckaert R, Laute M. Tumor necrosis factor receptors: biology and therapeutic potential in kidney diseases. *Am J Nephrol* 2012; 36: 261–270.
33. Grell M, Becke FM, Wajant H, et al. TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur J Immunol* 1998; 28: 257–263.
34. Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, et al. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9292–9296.
35. Cossburn M, Ingram G, Hirst C, et al. Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2012; 18: 45-54.
36. Bove R, Chitnis T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clinical Immunology* 2013; 149: 201–210.
37. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83: 278–286.

38. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015; 14: 183–193.
39. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, et al. Multiple sclerosis. *Lancet* 2018; 391: 1622-1636.
40. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* 2007; 14: 529-533.
41. Mandia D, Ferraro OE, Nosari G. Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11: 6417-6432.

**Table 1** Socio-demographic, clinical and inflammatory biomarker data in patients with multiple sclerosis and controls

Characteristics	Controls (n=70)	MS (n=168)	F/X <sup>2</sup>	df	P value
Age (years)	45.16 (0.97)	42.02 (1.06)	3.17	1/236	0.076
Sex					
Male/Female	17 (24.3)/ 53 (75.7)	49 (29.2)/119 (70.8)	0.587	1	0.443
Ethnicity					
C/NC	54 (77.1)/16 (22.9)	132 (78.6)/36 (21.4)	0.059	1	0.808
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.25 (0.50)	25.53 (0.39)	1.063	1/235	0.304
Smoking (Y/N)	7 / 63	19 / 147	0.11	1	0.746
Diabetes mellitus (Y/N)	13 / 44	10 / 158	13.17	1	<0.001
SAH (Y)	13 / 44	33 / 135	0.26	1	0.609
MetS (Y)	17 (24.3)	43 (25.9)	0.068	1	0.794
TNF- $\alpha$ (pg/mL)*	1.20 (0.60)	60.55 (26.09)	336.24	1/236	<b>&lt;0.001</b>
sTNFR1(pg/mL)*	981.33 (56.43)	1047.66 (31.02)	0.344	1/195	0.588
sTNFR2 (pg/mL)*	1435.86 (68.75)	2020.18 (52.82)	21.55	1/195	<b>&lt;0.001</b>
IL-6 (pg/mL)*	7.16 (2.24)	20.65 (8.50)	369.10	1/175	<b>&lt;0.001</b>
IL-17 (pg/mL)*	0.55 (0.29)	31.41 (14.95)	141.07	1/175	<b>&lt;0.001</b>
IFN- $\gamma$ (pg/mL)*	1.50 (0.27)	12.11 (6.44)	5.88	1/175	<b>0.016</b>
IL-2 (pg/mL)*	0.91 (0.22)	8.82 (5.32)	152.74	1/175	<b>&lt;0.001</b>
IL-10 (pg/mL)*	0.29 (0.20)	25.30 (9.52)	469.10	1/175	<b>&lt;0.001</b>
IL-4 (pg/mL)*	1.51 (1.00)	71.22 (47.99)	280.76	1/175	<b>&lt;0.001</b>

All results of analyses of variance (F values). X<sup>2</sup>: results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as mean and SEM and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). BMI: body mass index; SAH systemic arterial hypertension; MetS: metabolic syndrome; TNF-  $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2; IL-6: interleukin 6; IL-17: interleukin 17; IFN-  $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; IL-2: interleukin 2; IL-10: interleukin 10; IL-4: interleukin 4. \*These variables were processed in Ln transformation.

**Table 2** Results of multivariate GLM analysis with tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and TNF receptor sTNFR1 and sTNFR2 as dependent variables

Type test	Dependent variables	Explanatory variables	F/X <sup>2</sup>	df	P value	Partial Eta square
Multivariate	TNF- $\alpha$	Diagnosis	62.61	3/188	< <b>0.001</b>	0.500
	sTNFR1	Sex	0.12	3/188	0.948	0.002
	sTNFR2	Age	6.05	3/188	<b>0.001</b>	0.088
		BMI	3.80	3/188	<b>0.011</b>	0.057
		Ethnicity	0.77	3/188	0.513	0.012
Between subject effects	TNF- $\alpha$	Diagnosis (+)	153.04	1/190	< <b>0.001</b>	0.446
	sTNFR1	BMI (+)	5.98	1/190	<b>0.015</b>	0.031
	sTNFR2	Diagnosis (+)	26.67	1/190	< <b>0.001</b>	0.123
		Age (+)	18.21	1/190	< <b>0.001</b>	0.087
		BMI (+)	9.26	1/190	<b>0.003</b>	0.046

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; BMI: body mass index; TNF-  $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2;

**Table 3** Model-generated estimated marginal means in z scores (SE) of TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 in multiple sclerosis (MS) patients and controls. These results were obtained by the GLM analyses shown in Table 2

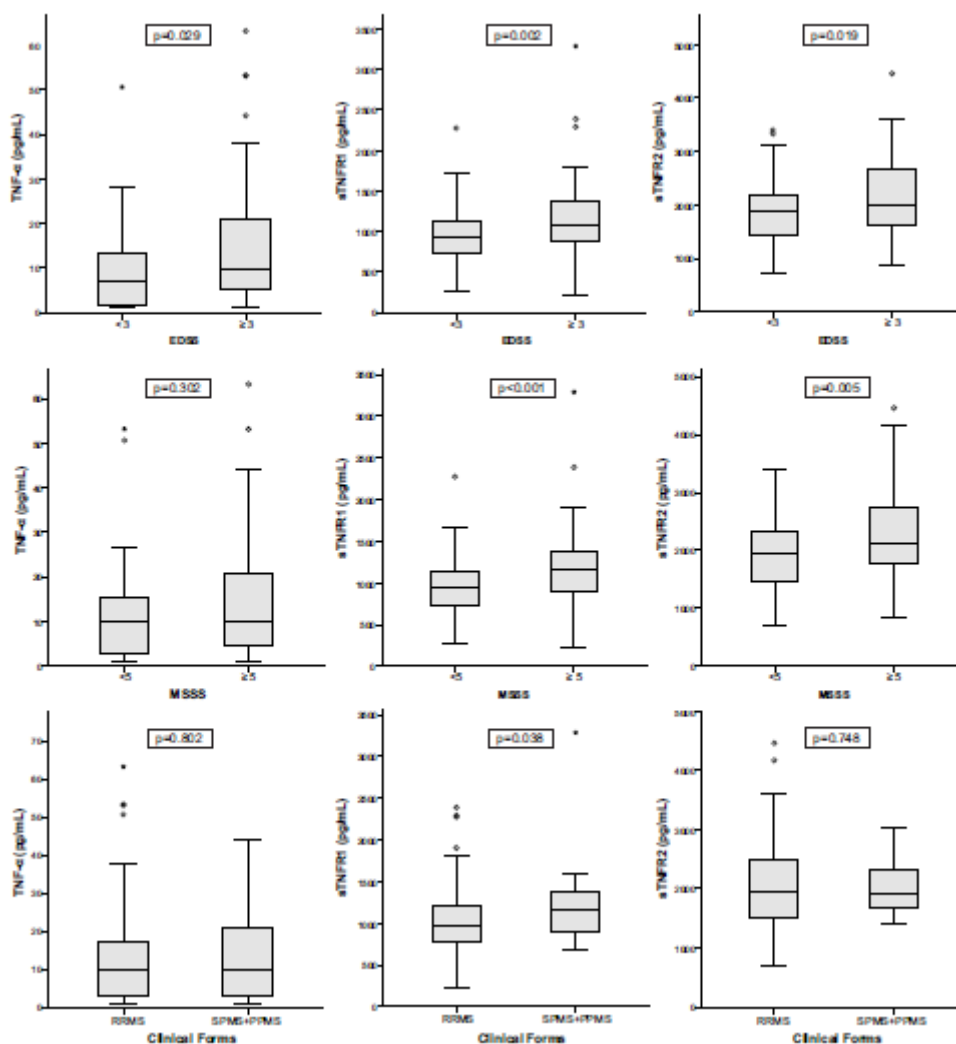
	Controls	MS	F	df	<i>P</i> value
(Ln) TNF- $\alpha$ (z scores)	-1.163 (0.131)	0.498 (0.064)	68.89	1/126	<0.001
(Ln) sTNFR1 (z scores)	-0.038 (.194)	0.087 (0.095)	2.18	1/126	0.112
(Ln) sTNFR2 (z scores)	-0.731 (.175)	0.196 (0.086)	6.51	1/126	0.012

TNF-  $\alpha$ : tumor necrosis factor  $\alpha$ ; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2 \*These variables were processed in Ln transformation; the analysis was adjusted for age, sex, body mass index and ethnicity.

**Table 4** Result of binary logistic regression analysis with an increased disability (EDSS score  $\geq 3$ ), disease progression (MSSS $\geq 5$ ) and progressive clinical forms of multiple sclerosis as dependent variables

Dependent variables	Explanatory variables	Wald	df	P value	OR	95% CI
Model # 1 EDSS $\geq 3$	Age	19.82	1	<0001	1.069	1.038 - 1.101
	sTNFR1	7.36	1	0.007	1.653	1.150 – 2.377
Model # 2 MSSS $\geq 5$	Age	4.82	1	0.028	1.031	1.003 – 1.059
	sTNFR1	9.92	1	0.002	1.90	1.274 – 2.835
Model # 3 ProgMS	Age	14.20	1	<0.001	1.084	1.039 - 1.130
	Male sex	4.75	1	0.029	3.219	1.125 – 9.214
	sTNFR1	3.88	1	0.049	2.048	1.003 – 4.179
	sTNFR2	4.01	1	0.045	0.495	0.251 – 0.986
Model # 4 ProgMS	Age	16.32	1	<0.001	1.084	1.043 – 1.128
	Male sex	4.76	1	0.029	3.222	1.126 – 9.218
	zsTNFR1_zsTNFR2	5.09	1	0.024	2.000	1.095 – 3.655

EDSS: Expanded Disability Status Scale; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; ProgMS: progressive clinical forms of multiple sclerosis; df: degree of freedom; OR: odds ratio; CI: confidence interval; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2; sTNFR1 and sTNFR2 are entered in z scores of Ln transformations; zsTNFR1\_zsTNFR2 is computed as z score of Ln sTNFR1 – z Ln sTNFR2. Model 1#: Sensitivity=74.6, Specificity=73.8%, correct cases=73.6%,  $R^2$  Nagelkelke=0.262 ( $X^2=19.62$ ,  $df=2$ ,  $p<0.001$ ); Model 2#: Sensitivity=58.5%, Specificity=72.2%, correct cases=66.0%,  $R^2$  Nagelkelke=0.170 ( $X^2=19.62$ ,  $df=2$ ,  $p<0.001$ ); Model 3#: Sensitivity=66.7%, Specificity=89.8%, correct cases=86.9%,  $R^2$  Nagelkelke=0.285 ( $X^2=27.43$ ,  $df=4$ ,  $p<0.001$ ); Model 4#: Sensitivity=66.7%, Specificity=73.8%, correct cases=89.1%,  $R^2$  Nagelkelke=0.285 ( $X^2=27.43$ ,  $df=3$ ,  $p<0.001$ );



**Figure 1** - Plasmatrics levels of TNF- $\alpha$ , sTNFR1 and sTNFR2 according to the disability, disability progression and clinical forms of multiple sclerosis (MS)

EDSS: Expanded Disability Status Scale; < 3: mild disability;  $\geq$  moderate/high disability; TNF: tumor necrosis factor; sTNFR1: soluble tumor necrosis factor receptor 1; sTNFR2: soluble tumor necrosis factor receptor 2; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; < 5: no progression;  $\geq$  5: progression; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis.

## 6 CONCLUSÕES

- Os níveis de TNF- $\alpha$  e sTNFR2 foram mais elevados nos pacientes com EM do que nos controles, enquanto que os valores de sTNFR1 não diferiram entre os dois grupos diagnósticos;
- O diagnóstico de EM exerceu um efeito considerável nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e um efeito modesto nos níveis séricos de sTNFR2 enquanto que o IMC e idade mostraram um efeito modesto nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e seus receptores solúveis;
- As variáveis idade e aumentos nos níveis de sTNFR1 foram positivamente associadas com a incapacidade dos pacientes com EM;
- Pacientes com níveis elevados de sTNFR1 e aumento da idade mostraram maior chance, embora modesta, de progressão da doença;
- Idade, sexo masculino e níveis elevados de sTNFR1 foram variáveis positivamente associadas com as formas clínicas progressivas de EM, enquanto que o aumento dos níveis de sTNFR2 pode exercer um efeito protetor para o desenvolvimento das formas progressivas da EM.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Algumas limitações devem ser consideradas como o delineamento transversal do presente estudo e o número limitado de pacientes com as formas clínicas progressivas da EM. No entanto, o uso da escala de MSSS para avaliar a progressão da doença e a análise estatística robusta que considerou as principais variáveis confundidoras para os biomarcadores avaliados, fortalecem o estudo e garantem a confiabilidade dos resultados obtidos.

Ao nosso conhecimento, o presente estudo é o primeiro a avaliar a associação entre TNF- $\alpha$ , sTNFR1 e sTNFR2 com o diagnóstico de EM, bem como com a incapacidade, progressão da doença e formas clínicas de EM. Os dados obtidos neste estudo suportam a hipótese de que o TNF- $\alpha$  e seus receptores estão envolvidos na imunopatogênese da EM, com uma clara evidência do papel do sTNFR1 na incapacidade, progressão da doença e formas clínicas. Além disso, nossos resultados mostraram que os altos níveis de sTNFR2 associados à presença de EM podem ser explicados como uma resposta compensatória exercendo um efeito protetor para modular os mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença. Esses resultados também sugerem que o bloqueio específico do TNFR1 pode ser uma abordagem terapêutica possível para o tratamento de pacientes com EM, principalmente aos que apresentam com formas clínicas progressivas que não respondem às terapias atualmente disponíveis para o seu tratamento.

## 8 REFERÊNCIAS

ALATAB, S.; MAGHBOOLI, Z.; HOSSEIN-NEZHAD, A. et al. Cytokine profile, Foxp3 and nuclear factor-kB ligand levels in multiple sclerosis subtypes. **Minerva Med**, v. 102, p. 461-468, 2011.

ALEXOPOULOU, L.; KRANIDIOTI, K.; XANTHOULEA, S. et al. Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity. **European Journal of Immunology**, v. 36, no. 10, p. 2768–2780, 2006.

AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H.E.; The cellular immunology of multiple sclerosis. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 65, p. 444-452, 1999.

ALONSO, A.; HERNAN, M.A.; Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. **Neurology**, v. 71, p. 129–135, 2008.

ARGAW, A.T.; ZHANG, Y.; SNYDER, B.J. et al. IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hipóxia-angiogenesis program. **Journal of Immunology**, v. 177, p. 5574-5584, 2006.

ARNETT, H.; MASON J.; MARINO, M. TNF $\alpha$  promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. **Nature Neuroscience**, v. 4, p. 1116–1122, 2001.

BADIOLA, N.; MALAGELADA, C.; LLECHA, N. et al. Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells, **Neurobiology of Disease**, v. 35, p. 438–447, 2009.

BAHARNOORI, M.; LYONS, J.; DASTAGIR, A. et al. Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**, v. 3, e274, 2016.

BARANZINI, S. E.; OKSENBERG, J. R. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years. **Trends Genet**, v. 33, p. 960–970, 2017.

BERGAMASCHI, R. Prognostic factors in multiple sclerosis. **International Review of Neurobiology**, v.79, p. 423-447, 2007.

BJATMAR. C.; WIJEK, J.R.; TRAPP, B.D. Axonal loss in the pathology ofMS: consequence for understanding the progressive phase of disease. **J Neurol Sci**, v. 206, p. 165–171, 2003.

BRADLEY, J.R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v.214, p. 149–160, 2008.

Brazil. Brazilian Institute of Geography and Statistics. Characteristics of the population and households: results of the universe, 2011

[https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas\\_da\\_populacao/default\\_caracteristicas\\_da\\_populacao.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). Accessed 3 Jul 2018.

BROWNLEE, W. J.; SWANTON, J.K.; ALTMANN, D.R. et al. Earlier and more frequent diagnosis of multiple sclerosis using the MacDonald criteria. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 86, p. 584-585, 2015.

BROWNLEE, W.J; MILLER, D.H. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. **J CLIN NEUROSCI**, v. 21, p. 2065-71, 2014.

CHEN, K.B.; UCHIDA, K.; NAKAJIMA, H. et al., Tumor necrosis factor- $\alpha$  antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury, **Spine**, v. 36, 17, p. 1350–1358, 2011.

CHU, F.; SHI, M.; ZHENG, C. et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **J Neuroimmunol**, v. 318, p. 1-7, 2018.

CLAES, N.; FRAUSSEN, J.; STINISSEN P. et al. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. **Front Immunol**, v. 21, 642, 2015.

CLAUSSEN, M.C.; KORN, T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. **Clin Immunol**, v. 142, p. 49–56, 2012.

COHEN, J.A.; BARKHOF, F.; COMI, G. et al. TRANSFORMS Study Group. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 362, p. 402–415, 2010.

COHEN, J. A. et al. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. **Lancet**, v. 380, p. 1819–1828, 2012.

COLES, A. J. et al. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. **Lancet**, v. 380, p. 1829–1839, 2012.

- COMI, G.; RADAELLI, M.; SOELBERG, SP. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. **Lancet**, 389(10076), p. 1347-1356, 2017.
- CONFAVREUX, C.; O'CONNOR, P.; COMI, G. et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet Neurol**, v. 13, p. 247–56, 2014.
- CORREA, E.; PAREDES, V.; MARTINEZ, B. Prevalence of multiple sclerosis in Latin America and its relationship with European migration. **Multiple Sclerosis Journal Experimental Translational Clinical**, v. 2, p. 1-10, 2016.
- DARDALHON, V.; KORN, T.; KUCHROO V.K. et al. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. **J Autoimmun**, v. 31, p. 252–256, 2008.
- DENDROU, C.A.; FUGGER, L.; FRIESE, M.A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nat Rev Immunol**, v. 15, p. 545-558, 2015
- DIHB-JALBUT, S.; ARNOLD, D.L.; CLEVELAND, D.W. et al. Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. **J Neuroimmunol**, v. 176, p. 198–215, 2006.
- DOPP, J.M.; SARAFIAN, T.A.; SPINELLA, F.M. et al. Expression of the p75 TNF receptor is linked to TNF-induced NFkappaB translocation and oxyradical neutralization in glial cells. **Neurochem Res**, v. 27, p. 1535–1542, 2002.
- ENGELHARDT, B.; KAPPOS, L. “Natalizumab: targeting  $\alpha$ 4-integrins in multiple sclerosis,” **Neurodegenerative Diseases**, v. 5, p. 16–22, 2007.
- FISH, E.A. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature Reviews**, v. 8, p. 737-744, 2008.
- FISCHER R., WAJANT H., KONTERMANN R, et al. Astrocyte-specific activation of TNFR2 promotes oligodendrocytematuration by secretion of leukemia inhibitory factor, **Glia**, vol. 62, no. 2, p. 272–283, 2014.
- FISCHER, R.; KONTERMANN, R.E.; MAIER O. Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. **Antibodies**, v. 4, p. 48-70, 2015.
- FISCHER, R.; MAIER, O. Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. **Oxid Med Cell Longev**, 610813, 2015.
- FONTOURA, P.; GARREN, H. Multiple sclerosis therapies: molecular mechanisms and future. **Results Probl Cell Differ**, v. 51, p. 259-285, 2010.

- FÖRSTER.M.; KÜRY. P.; AKTAS, O. et al. Managing risks with immune therapies in multiple sclerosis, **Drug Saf**, 2019.
- GAO, H.; DANZI, M.C.; CHOI, C.S. et al. Opposing functions of microglial and macrophagic TNFR2 in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cell Rep**, v. 18, p. 198–212, 2017.
- GRABER, J.J.; FORD, D.; ZHAN M. et al. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlation with interferon dose and MRI response. **J Neuroimmunol**, v. 185, p. 168–174, 2007.
- GREGORY, A.P.; DENDROU, C.A.; ATTFIELD, K.E. et al. TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. **Nature**, v. 488, 508–511, 2012.
- GRIGORIADIS, N.; VAN, PESCH. V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. **Eur J Neurol**, Suppl 2, p. 3-13, 2015.
- GRUNDY, S.M.; CLEEMAN, J.I.; DANIELS, S.R. et al. American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, p. 2735–2752, 2005.
- HABBAS, S.; SANTELLO, M.; BECKER, D. et al. Neuroinflammatory TNF-alpha impairs memory via astrocyte signaling. **Cell**, v. 163, p. 1730–1741, 2015.
- HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Rev**, v. 70, p. 257–265, 2012.
- HAUSER, S.L.; DOOLITTLE, T.H.; LINCOLN, R. et al. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: Frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. **Neurology**, v. 40, p.1735–1739, 1990.
- HEDSTROM, A. K. et al. Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 82, p. 865–872, 2014.
- HEDSTROM, A. K. et al. Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. **Brain**, v. 134, p. 653–664, 2011.
- HEMMER, B.; KERSCHENSTEINER, M.; Korn, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **Lancet Neurol**, v.14, p. 406-419, 2015.

HOLMOY, T.; VON DER LIPPE, H.; LEEGAARD, T.M. *Listeria monocytogenes* infection associated with alemtuzumab - a case for better preventive strategies. **BMC Neurol**, v. 17:65, 2017.

IMAN, A.S.; GUYTON, M.K.; HAQUE, A. et al. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMSs from MS patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 190, p. 139-145, 2007.

KAIMEN-MACIEL, D.R.; REICHE, E.M.; BORELLI, S.D. et al. HLA-DRB1\* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. **Mol Med Rep**, v. 2, n. 6, p. 993-998, 2009.

KALLAUR, A.P.; OLIVEIRA, S.R.; SIMÃO A.N.C. et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. **Mol Med Rep**, v. 7, 1010-1020, 2013.

KALLAUR, A.P.; OLIVEIRA, S.R.; SIMÃO, A.N.C. et al. Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. **Mol Neurobiol**, v. 54, p. 2950-2960, 2017.

KALLIOLIAS, GD.; IVASHKIV, L.B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat Rev Rheumatol**, v. 12, p. 49-62, 2016.

KANTARCI, O.H.; MORALES, Y.; ZIEMER, P.A. et al. CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. **J Neuroimmunol**, v. 169, p. 137-143, 2005.

KAPPOS, L.; RADUE, E.W.; O'CONNOR, P. et al. FREEDOMS Study Group. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 362, p. 387-401, 2010.

KHAIBULLIN, T.; IVANOVA, V.; MARTYNOVA, E. et al. Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. **Front Immunol**, v.188, 531, 2017.

KOCH- HENRIKSEN, N; SORENSEN, P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **Lancet Neurol**. v. 9, p. 520-532, 2010.

KOCH, M.W.; GEORGE, S.; WALL, W. et al. Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v. 350, p. 46-50, 2015.

- KOCH, M.; MOSTERT, J.; HEERSEMA, D. et al. Progression in multiple sclerosis: further evidence of an age dependent process. **J Neurol Sci.** v. 255, p. 35-41, 2007.
- KOGUCHI, K.; ANDERSON, D.E.; YANG L. et al. Dysregulated T cell expression. Of TIM3 in multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1413-1418, 2006.
- KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, p.1444–1452, 1983.
- KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, p. 1444–1452, 1983.
- LJUBISAVLJEVIC, S.; STOJANOVIC, I.; CVETKOVIC, T. et al. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. **Journal of Neurological Sciences**, v. 337, p. 8-13, 2014.
- LUBLIN, F.D.; REINGOLD, S. C.; COHEN, J.A. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. **Neurology**, v. 83, p. 278-286, 2014.
- LUCCHINETTI, C.; BRUCK, W.; PARISI, J. et al. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implication for the pathogenesis of demyelination. **Ann Neurol**, v. 47, p. 707–717, 2000.
- MANDIA, D.; FERRARO, O.E.; NOSARI, G. et al. Environmental factors and multiple sclerosis severity: a descriptive study. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, p. 6417-6432, 2014.
- MARQUES, José Pinto. Esclerose Múltipla- Formas e fases da doença. In: PEDROSA, Rui Introdução a Esclerose Múltipla: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa: Biogen Indec, 2010, p. 155-161.
- MARQUES, V.D.; PASSOS, G.R.D.; MENDES, M.F. et al. Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis: Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. **Arq Neuropsiquiatr**, v.76, p. 539-554, 2018.
- MILLER, E.; WALCZAK, A.; SALUK, J. et al. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v.45, p. 26-30, 2012.

MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 518-524, 2014.

MOOTOO, A.; STYLIANOU, E.; ARIAS, M.A. et al. TNF-alpha in tuberculosis: A cytokine with a split personality. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v.8, p. 53–62, 2009.

MORGAN, M. J.; LIU Z.-G.; Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling, **Cell Research**, vol. 21, p. 103–115, 2011.

MORRIS, G.; MAES, M. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and encephalomyelitis disseminata/multiple sclerosis show remarkable levels of similarity in phenomenology and neuroimmune characteristics. **BMC Medicine**, v. 11, 205, 2013.

MYHR KM, TORKILDSEN Ø, LOSSIUS A. et al. B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis. **Expert Opin Biol Ther**, p. 1-11, 2019.

MURPHY, K.M.; REINER, S.L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, p. 933-944, 2002.

O'CONNOR, P.; WOLINSKY, J.S.; CONFAVREUX, C. et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. **N Engl J Med**, v. 365, p. 1293–303, 2011.

OH J.; VIDAL-JORDANA A.; MONTALBAN X Multiple sclerosis: clinical aspects. **Curr Opin Neurol**. 2018.

OLIVEIRA, S.R.; FLAUZINO, T.; SABINO, B.S. et al., Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. **Metab Brain Dis** v. 33, p. 1393-1399, 2018.

OLSSON, T.; BARCELLOS, L.F.; ALFREDSSON, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. **Nature Review Neurology**, v. 13, p. 25-36, 2017.

PATEL J.R, WILLIAMS J.L., MUCCIGROSSO M.M. et al., Astrocyte TNFR2 is required for CXCL12-mediated regulation of oligodendrocyte progenitor proliferation and differentiation within the adult CNS, **Acta Neuropathologica**, vol. 124, no. 6, pp. 847–860, 2012.

PEGORETTI, V.; BARON, W.; LAMAN, J.D. et al. Selective Modulation of TNF-TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. **Front Immunol**. v. 9, 925, 2018.

PEREIRA, A.B.C.N.G. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, p. 572-579, 2015.

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

POLMAN, C.H.; REINGOLD, S.C.; BANWELL B. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. **Ann Neurol**. v. 69, p. 292–302, 2011.

PROBERT, L. TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**. v. 302, p. 2-22, 2015.

REICH, D. S.; LUCCHINETTE, C. F.; CALABRESI, P. A. Multiple Sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, p. 169-180, 2018.

RODRIGUEZ-SAINZ, MDEL. C.; SANCHEZ-RAMON, S.; DE ANDRES, C. et al. Th1/Th2 cytokine balance and nitric oxide in cerebrospinal fluid and serum from patients with multiple sclerosis. **European Cytokine Network**, v. 13, p. 110-114, 2002.

ROXBURGH, R.H.; SEAMAN, S.R.; MASTERMAN, T. et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. **Neurology**, v.64, p. 1144-1151, 2005.

RUULS, S.R.; HOEK, R.M.; NGO, V.N et al. Membrane bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation, **Immunity**, vol. 15, p. 533–543, 2001.

SCHWAB, N.; SCHNEIDER-HOHENDORF, T.; WIENDL, H. Therapeutic uses of anti- $\alpha$ 4-integrin (anti-VLA-4) antibodies in multiple sclerosis, **International Immunology**, v. 27, p. 47–53, 2015.

SEDGER, L.M.; MCDERMOTT, M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 25 p. 453-472, 2014.

SHARIEF, M.K.; HENTGES, R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** v. 325, p.467–472, 1991.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple sclerosis. **Semin Neurol.** v. 36, p. 115-127, 2016.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol.** v. 23, p. 683-747, 2005.

STEELAND, S.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R.E. A New Venue of TNF Targeting. **Int J Mol Sci.** v. 19. pii: E1442, 2018.

SUNDQVIST, E. et al. Epstein- Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. **Genes Immun.** v. 13, p. 14–20, 2012.

SUTTON, C.E.; LALOR, S.J.; SWEENEY, C.M. et al. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from  $\gamma\delta$  Tcells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. **Immunity**, v. 31, p. 331–341, 2009.

SWEENEY, C.M.; LONERGAN, R.; BASDEO, S.A. et al. IL-27 mediates the response to IFN- $\beta$  therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. **Brain Behav Immun**, v. 25, p.1170–1181, 2011.

The Third Report of the National Cholesterol Education Program (NECP). Expert Panel on Detection. Evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA**, v. 285, p. 2486-2497, 2001.

THOMPSON, A.J.; BARANZINI, S.E.; GEURTS, J. et al. Multiple Sclerosis. **Lancet**, v. 391, p. 1622-1636, 2018a.

THOMPSON, A.J.; BANWELL, B.L.; BARKHOF, F. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **Lancet Neurol**, v. 17, p. 162–173, 2018b.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. **Nat Rev Neurol**, v. 15, p. 53-58, 2019.

TORKILDSEN, Ø.; MYHR, K.M.; BØ, L. Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications. **Eur J Neurol.** Suppl 1, p. 18-27, 2016.

TSENG, W.Y.; HUANG, Y.S.; LIN, H.H. et al. TNFR signalling and its clinical implications. **Cytokine.** v. 101, p. 19-25, 2018.

VAN HAUWERMEIREN. F.; VANDENBROUCKE, R.E.; LIBERT, C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 22, p.311-319, 2011.

VASCONCELOS, C.C.F. et al. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 151, p. 24-30, 2016.

VERMERSCH, P.; CZLONKOWSKA, A.; GRIMALDI, L.M. et al. Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial. **Mult Scler**, v. 20, p. 705–16, 2014.

VERONI, C.; GABRIELE, L.; CANINI, I. et al., Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. **Molecular and Cellular Neuroscience**, vol. 45, no. 3, p. 234–244, 2010.

VIGLIETTA, V.; MILLER, D.; BAR-OR, A. et al. Efficacy of delayed-release dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: integrated analysis of the phase 3 trials. **Ann Clin Transl Neurol**, v.2, p.103–118, 2015.

VOJDANI, A.; LAMBERT, J. The role of Th17 in neuroimmune disorders: target for CAM therapy. Part I. **Evid Based Complement Alternat Med**, 927294, 2011.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death Differ**, v. 10, p. 45–65, 2003.

WILLIS, M.D.; HARDING, K.E.; PICKERSGILL, T.P. et al. Alemtuzumab for multiple sclerosis: Long term follow-up in a multi-centre cohort. **Mult Scler**, v. 22, v.1215-23, 2016.

WINKELMANN, A.; LOEBERMANN, M.; REISINGER, E.C. et al. Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. **Nat Rev Neurol**, v. 12, p. 217-33, 2016.

YANG, S.; WANG, J.; BRAND, D.D. et al. (2018) Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. **Front Immunol** v. 9, 784, 2018.

YAMOUT, B.I.; ALROUGHANI, R. Multiple Sclerosis. **Semin Neurol**, v. 38, p. 212-225, 2018.

ZHOU, Z.; CONNELL, M.C. MACEWAN, D. J. TNFR1-induced NF- $\kappa$ B, but not ERK, p38MAPK or JNK activation, mediates TNF-induced ICAM-1 and VCAM-1 expression on endothelial cells. **Cellular Signalling**, vol. 19, no. 6, p. 1238–1248, 2007.

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 1)

**Por favor, leia cuidadosamente este consentimento e não hesite em perguntar sobre qualquer dúvida que tenha.**

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um projeto de pesquisa com o título “O papel do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral beta (TNF- $\beta$ ) e o desenvolvimento e curso clínico de esclerose múltipla, na população brasileira”. O estudo será desenvolvido sob a coordenação da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UEL (telefone 43-3371-2321) com a colaboração do professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel, do departamento de Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde (43-3371-2234) e demais professores da UEL. Cabe ao (a) senhor (a) decidir se pretende participar ou não. Caso não tenha condições de ler e/ou compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

O projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar uma possível associação entre o gene do TNF-beta, uma molécula inflamatória, e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla. Neste momento em que o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do estudo, o diagnóstico de esclerose múltipla e as formas de tratamento já foram definidos pela equipe médica responsável pelo seu atendimento e a sua participação ou não no trabalho depende exclusivamente da sua vontade e não irá absolutamente modificar os rumos do seu tratamento, seja qual for a sua opção (participação ou não no estudo).

A sua participação no estudo implica na utilização de uma amostra do seu sangue, que foi coletada durante sua participação em dois projetos de pesquisa desenvolvidos anteriormente, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UEL, coordenados pelo professor Dr. Damacio Ramon Kaimen-Maciel e com a participação de outros pesquisadores. Os projetos estudaram o papel de outros fatores genéticos, como o sistema HLA e o CCR5, no desenvolvimento da esclerose múltipla. O primeiro projeto foi sobre “Genotipagem do sistema de antígeno leucocitário humano (HLA) classe II em pacientes com esclerose múltipla” e teve como objetivo avaliar uma possível associação entre os genes do sistema HLA e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla (Parecer n. 206/05 de 15 de setembro de 2005). Com a amostra de DNA extraído do sangue coletado, determinou-se os alelos dos genes do sistema HLA por métodos de biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma associação do HLA com o risco de desenvolvimento e o curso clínico da esclerose múltipla e sugerem que o genótipo do HLA pode ser um biomarcador para a doença.

O segundo projeto que o (a) senhor (a) participou foi “Polimorfismo genético do receptor de quimiocina CCR5 e a susceptibilidade e curso clínico da esclerose múltipla” e teve como

objetivo avaliar uma possível associação entre o gene do receptor de uma proteína envolvida na resposta inflamatória e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla (Parecer n.207/05, de 15 de setembro de 2005). Com a amostra de DNA extraído do sangue coletado, determinou-se os alelos do gene CCR5 por métodos de biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma associação entre este gene e presença das lesões observadas na ressonância nuclear magnética dos pacientes com esclerose múltipla, sugerindo um papel deste fator genético no curso clínico da doença e que o genótipo do CCR5 pode ser um biomarcador para a doença.

A amostra de sangue coletada durante a sua participação nestes dois projetos de pesquisa foi armazenada no *freezer*, sob a responsabilidade da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, no Laboratório de Análises Clínicas do HU, e foi identificada com número, sem a possibilidade da identidade do (a) senhor (a) ser revelada a outras pessoas que não participam do estudo. Solicitamos sua autorização para que esta amostra possa ser utilizada no desenvolvimento de um novo projeto de pesquisa para o estudo de um outro gene chamado fator de necrose tumoral beta (TNF-beta) para avaliar se existe associação entre este gene e o desenvolvimento e progressão da esclerose múltipla. O mesmo estudo já foi realizado em outras populações mundiais mas não foi realizado na população brasileira, e os resultados poderão contribuir para o melhor conhecimento do desenvolvimento da doença assim como a possibilidade de se sugerir novas formas de tratamento da doença na nossa população.

Sua decisão para permitir a utilização da amostra armazenada é voluntária e em qualquer momento o (a) senhor (a) pode retirar o consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. Não haverá necessidade de coletar amostras de sangue específicas para este projeto de pesquisa. Neste documento, solicitamos também ao (a) senhor (a) a autorização para que o material armazenado possa, posteriormente, ser armazenado para uso futuro. Comprometemos a submeter à análise do Comitê de Ética em Pesquisa os novos projetos de pesquisa.

Informamos que os dados pessoais fornecidos e os resultados do exame realizado serão mantidos sob sigilo e somente serão utilizados para fins de pesquisa. Durante todas as etapas do projeto, os participantes serão identificados por um número codificado que será utilizado nas análises posteriores para garantir a preservação da integridade do indivíduo, garantir o anonimato e evitar a quebra de confidencialidade. Ao final do projeto, os resultados serão divulgados em forma de artigos científicos e comunicações em eventos científicos, sempre mantendo o sigilo da identidade dos participantes.

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua participação. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os

resultados da análise genética do gene TNF, objeto deste estudo, durante o seu atendimento, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

Eu estou disposto a participar dessa pesquisa e compreendi as condições acima descritas, concordo voluntariamente a participar desse estudo.

Assinaturas

Paciente ou representante legal (caso o paciente esteja impossibilitado de assinar ou compreender o conteúdo deste TCLE)

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Local e data: \_\_\_\_\_

Profissional que obteve o TCLE

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Local e data: \_\_\_\_\_

Pesquisador responsável: Nome: Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440;

Fone: 43-3371-2321 (Imunologia), 43-3371-2670 (Diagnóstico Molecular)

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina:

Fone: 43-3371-2490

**APÊNDICE B: Questionário Projeto EM**

<i>Dados demográficos</i>		Nº no projeto:	
Nome			
Endereço			
Telefone			
Data de nascimento			
Imunomodulador	( ) IFN-β1a ( ) IFN-β1b ( ) Glatiramer ( ) Natalizumab		
Corticóide	( ) Pulsoterapia ( ) Corticóide oral → mg		
Outros medicamentos			
Doenças associadas			
Etnia	( ) Caucasiano ( ) Negro ( ) Mulato ( ) Asiático		
Cor da pele	( ) Branca ( ) Negra ( ) Pardo ( ) Amarela		
Exposição solar diária	( ) Não se expõe ao sol diariamente ( ) Baixa exposição ( ≤ 20 min/dia ) ( ) Exposição solar adequada ( > 20 min/dia )		
Usa protetor solar?	( ) Sim ( ) Não	Frequência:	
Tabagismo	( ) Sim ( ) Não		
Consumo de álcool	( ) Sim ( ) Não		
Profissão			
Hábitos de dieta	( ) Suplementação alimentar ( ) Antioxidante ( ) Vitamina ( ) Dieta específica		
	Obs.:		
<i>Dados Clínicos</i>			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Forma clínica	( ) RR ( ) SP ( ) PP ( ) CIS ( ) não definida		
EDSS 2013			
Atividade da doença	( ) Remissão ( ) Surto		
Nº de surtos/ ano			
RMN	Nº lesões:	( ) Gd+ ( ) Gd-	Data RMN:
	Local:		
	Tipo de RMN:		
Inflamação/ Infecção	( ) Sim ( ) Não	Qual?	
Pós Menopausa	( ) Sim ( ) Não	Data última menstruação:	

## ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos da UEL



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**

Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná  
Registro CONEP 268

<p>Parecer PF Nº. 074/09 CAAE Nº. 0070.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO Nº. 251304</p>	<p>Londrina, 20 de abril de 2010.</p>
<p>PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE CCS/PAC</p>	
<p>Prezada Senhora:</p> <p>O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96. do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p><b>"O PAPEL DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA (TNF-BETA) E O DESENVOLVIMENTO E CURSO CLÍNICO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA"</b></p>	
<p>Situação do Projeto: <b>APROVADO</b></p> <p>Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/Uel relatório final da pesquisa.</p>	
<p>Atenciosamente,</p>  <p><b>Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel</b></p> <p>Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/Uel</p>	