



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TAMIRES FLAUZINO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS E DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DA VARIANTE rs3761548 NO GENE *FOXP3*  
EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

---

Londrina  
2019

TAMIRES FLAUZINO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS E DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DA VARIANTE rs3761548 NO GENE *FOXP3*  
EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche  
Co-orientadora: Prof. Dra. Andréa Name Colado  
Simão

Londrina  
2019

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

Flauzino, Tamires.

Avaliação de marcadores imunológicos, metabólicos e de estresse oxidativo e da variante rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes com esclerose múltipla / Tamires Flauzino. - Londrina, 2019.  
140 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Estresse oxidativo - Tese. 4. Variante rs3761548 no gene *FOXP3* - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

TAMIRES FLAUZINO

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS, METABÓLICOS E DE ESTRESSE  
OXIDATIVO E DA VARIANTE rs3761548 NO GENE *FOXP3* EM PACIENTES COM  
ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Damacio Ramón Kaimen Maciel  
Irmandade Santa Casa de Londrina – ISCAL

---

Prof. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Sayonara Rangel Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Marla Karine Amarante  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. José Wander Breganó  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 11 de abril de 2019.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus que me deu condições para realizar este trabalho e que colocou pessoas tão especiais no meu caminho. Aos meus pais, que acreditaram no meu potencial e que me apoiaram por todos estes anos. Ao meu noivo, que tem me apoiado muito, principalmente nesta reta final.

À minha querida orientadora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, a quem tenho um profundo respeito, carinho e admiração pela grande sabedoria, que sempre foi uma inspiração como professora e orientadora e que possibilitou o desenvolvimento e conclusão desta tese. Muito obrigada por todos esses anos juntas, pela confiança e por não medir esforços, sempre me ajudando e me orientando com carinho e paciência.

À professora Dra. Andrea Name Colado Simão, que foi minha co-orientadora durante o doutorado e que além de ter participação essencial no desenvolvimento deste trabalho, me proporcionou inúmeras oportunidades para que eu pudesse crescer pessoalmente e profissionalmente, a quem sou grata e tenho uma imensa admiração por todo trabalho desenvolvido. Obrigada por sempre confiar em meu trabalho e por não medir esforços em me orientar e me ajudar em tudo que foi preciso.

À professora Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida e ao professor Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy que sempre contribuíram para a minha formação.

Aos colegas de trabalho, Dr. Damacio Ramón Kaimen Maciel e Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Aos funcionários do Setor de Imunologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Londrina, pela colaboração durante todo o mestrado e doutorado.

Flauzino, Tamires. **Avaliação de marcadores imunológicos, metabólicos e de estresse oxidativo e da variante rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes com esclerose múltipla.** 2019. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## RESUMO

**Introdução:** A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica, desmielinizante, imuno-mediada, com envolvimento de muitos mecanismos fisiopatológicos que acometem o sistema nervoso central. Sua etiologia é complexa e multifatorial com a interação entre fatores genéticos, falha da tolerância imunológica e fatores ambientais. A EM apresenta heterogeneidade no seu curso clínico, progressão da incapacidade, formas clínicas e resposta ao tratamento. Portanto, a busca por biomarcadores que possam ser úteis para auxiliar o diagnóstico, prever incapacidade e sua progressão ao longo do tempo, tem sido objeto de estudos. **Objetivo:** Avaliar um conjunto de biomarcadores imuno-inflamatórios, metabólicos, de estresse oxidativo/nitrosativo e a variante rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes com EM. **Metodologia:** O estudo incluiu 170 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 182 indivíduos saudáveis. Os pacientes foram classificados com EM remitente-recorrente (EMRR) e EM progressiva, que compreende as formas clínicas EM primariamente progressiva e EM secundariamente progressiva. A incapacidade foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), sendo categorizada em leve (EDSS <3,0) e moderada/grave (EDSS ≥3,0). A progressão da doença foi avaliada pela escala *Multiple Sclerosis Severity Score* (MSSS) e foi considerada progressão quando MSSS ≥5,0. Os dados sociodemográficos, antropométricos, epidemiológicos e clínicos foram obtidos utilizando um questionário padronizado. Amostras de sangue periférico foram coletadas para a determinação de biomarcadores imuno-inflamatórios, tais como interleucina (IL)-6, IL-17, IL-10 e fator de transformação do crescimento (TGF)-β1 e biomarcadores metabólicos como presença de síndrome metabólica (SM), níveis plasmáticos de glicose, níveis séricos de ácido úrico, homocisteína; insulina, colesterol total (CT), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e triglicerídeos; biomarcadores de estresse oxidativo e nitrosativo como peroxidação lipídica (hidroperóxidos), produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), dosagem de proteínas carbonílicas e metabólitos do óxido nítrico (NOx). A identificação dos genótipos da variante rs3761548 do gene *FOXP3* foi realizada em amostras de DNA genômico extraído das células do sangue periférico. Uma sequência de 155 pares de bases do gene *FOXP3* foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). **Resultados:** Os resultados foram apresentados em dois artigos. No primeiro artigo científico, foram incluídos 122 pacientes com EM. Pacientes com EDSS ≥3,0 tinham idade mais avançada e apresentaram níveis elevados de homocisteína, ácido úrico, AOPP, LDL e maior proporção de SM, enquanto os níveis de HDL foram mais baixos quando comparados aos pacientes com EDSS <3,0. Um modelo de análise demonstrou que 36,3% da variação no escore EDSS pode ser explicado pela idade, pelo escore da resposta Th17/T regulatória (Treg), LDL/HDL e homocisteína (todos positivamente) e inversamente ao índice de massa corpórea (IMC).

Após ajustar pelos diferentes esquemas de tratamento para EM usados pelos pacientes, os efeitos da idade, homocisteína e dos scores Th17/Treg e LDL/HDL na incapacidade continuaram significativos, enquanto que os efeitos do IMC não foram mais associados. Além disso, as proteínas carbonílicas foram associadas com o aumento no EDSS. No segundo artigo, foram incluídos 170 pacientes com EM (121 mulheres e 49 homens) e 182 controles saudáveis (130 mulheres e 52 homens), controlados pela idade, sexo, etnia, índice de massa corporal (IMC) e tabagismo. A mediana do EDSS nesta coorte de paciente com EM foi 3,0, utilizado como ponto de corte para a categorização dos pacientes para este artigo. Os pacientes com EM apresentaram níveis mais altos de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 quando comparado aos controles ( $p < 0,001$ ). Em análise multivariada com TGF- $\beta$ 1 e IL-10 como variáveis dependentes e o diagnóstico como variável explanatória ajustando-se à idade, sexo, IMC, etnia e tabagismo, constataram que o diagnóstico de EM, idade e tabagismo apresentaram efeitos significativos no níveis de TGF- $\beta$ 1 e IL-10. Testes para efeitos entre indivíduos mostraram que o diagnóstico de EM estava positivamente associado com os níveis de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 e exercia um efeito em seus níveis de 40,3% e 32,5%, respectivamente. A distribuição dos genótipos CC, CA e AA em modelos codominantes, dominantes e recessivos, assim como do alelo A, diferiu de pacientes com EM e controles em mulheres, sendo associados com a suscetibilidade à EM. No modelo dominante, a frequência dos genótipos CA + AA em mulheres com EM foi maior do que em mulheres saudáveis, com *odds ratio* (OR) de 2,57 [intervalo de confiança (IC) de 95%: 1,50-4,37]. TGF- $\beta$ 1 (OR 1,026, IC95%: 1,001-1,053,  $p = 0,045$ ) e incapacidade moderada/grave incapacidade (EDSS > 3) (OR: 2,678, IC 95%: 1,026-6,995,  $p = 0,044$ ) foram positivamente associados aos genótipos CA + AA. Após ajuste com os fatores confundidores (idade, etnia, tabagismo, idade de diagnóstico e tratamento para EM), somente os valores de TGF- $\beta$ 1 permaneceram associados aos genótipos CA + AA (OR 1,027, 95%IC: 1,001-1,054,  $p=0,043$ ). **Conclusão:** No primeiro artigo, os resultados demonstraram que a relação entre a resposta Th17/Treg, juntamente com a idade, níveis aumentados de proteína carbonílica e homocisteína e o escore LDL/HDL foram associados com a incapacidade. No segundo artigo, nossos resultados demonstraram que a variante rs3761548 *FOXP3* foi associada ao diagnóstico de EM em mulheres. Além disto, em mulheres com EM, os genótipos CA+AA foram associados aos níveis mais elevados de TGF- $\beta$ 1 quando comparadas com as do genótipo CC. Esses dados sugerem que o alelo A da variante *FOXP3* -3279 C> A pode exercer um papel no número e função das células Treg e pode ser um dos fatores envolvidos na suscetibilidade das mulheres à EM. Estes resultados reforçam que o perfil imuno-inflamatório, metabólico, o estresse oxidativo e nitrosativo, e as variantes genéticas desempenham um papel fundamental no curso clínico da doença e podem ser possíveis novos alvos para o tratamento desses pacientes.

**Palavras-chave:** Esclerose múltipla. Incapacidade. Inflamação. Estresse oxidativo. Variante genética rs3761548. *FOXP3*. TGF- $\beta$ 1.

Flauzino, Tamires. **Evaluation of immune-inflammatory, metabolic and oxidative biomarkers and the rs3761548 *FOXP3* gene variant in patients with multiple sclerosis.** 2019. 142 p. Thesis (Doctoral in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic, demyelinating, immuno-mediated inflammatory disease with involvement of many pathophysiological mechanisms that affect the central nervous system. Its etiology is complex and multifactorial with interactions between genetic factors, breakdown of immunological tolerance and environmental factors. The MS shows heterogeneity in its clinical course, disability, disability progression, clinical forms and response to therapy. Therefore, the search for biomarkers that may help the diagnosis, predict the disability and disability progress over time, has been the subject of studies. **Objective:** The objective of the present study was to evaluate a set of immune-inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress biomarkers, and the rs3761548 *FOXP3* gene variant in patients with MS. **Methods:** The study included 172 MS patients of both sexes, aged 18 to 70 years, attended the Demyelinating Diseases Outpatient Clinic of the University Hospital of Londrina and 70 healthy individuals selected from blood donors at the Regional Blood Center of Londrina and population in general. Patients were classified as relapsing-remitting MS (RRMS) and progressive MS, which comprised primary progressive MS and secondary progressive MS. Disability was assessed by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). The disability was categorized as mild (EDSS <3.0) and moderate/severe (EDSS ≥3.0). Disease progression was assessed using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) scale and was considered progression when MSSS ≥5.0. Sociodemographic, anthropometric, epidemiological and clinical data were obtained using a standardized questionnaire. Peripheral blood samples were collected for the determination of immuno-inflammatory biomarkers, such as interleukin (IL)-6, IL-17, IL-10, transforming growth factor (TGF)-β1 and metabolic biomarkers were the presence of metabolic syndrome (MetS), plasma glucose levels, serum uric acid levels, homocysteine, insulin, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL), high-density lipoprotein cholesterol (HDL) and triglycerides; biomarkers of oxidative and nitrosative stress were lipid peroxidation (hydroperoxides), advanced oxidation protein products (AOPP), determination of carbonyl proteins and nitric oxide metabolites (NOx). For identification of the rs3761548 variant of the *FOXP3* gene, the DNA genomic was extracted from the peripheral blood cells. A 155 base pair sequence of the *FOXP3* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods. **Results:** The results were discussed in two articles. In the first article, a total of 122 patients with MS were included. Patients with EDSS ≥3 were older and showed higher homocysteine, uric acid, AOPP and LDL-cholesterol and higher rate of MetS, while HDL-cholesterol was lower than in patients with EDSS<3. Initially, 36.3% of the variance in EDSS score were explained by age, a Th17/T regulatory (Treg) profile, LDL/HDL ratio and homocysteine (all positively related) and body mass index (BMI) (inversely related); however, after adjusted for the MS therapy, the effects of zLDL/HDL, zTh17/Treg, homocysteine and age on disability remained and BMI was no longer significant. Moreover, carbonyl proteins were associated with increased disability. In the second study, 170 MS

patients (121 female and 49 male) and 182 healthy controls (130 female and 52 male) were included. As expected, MS patients did not differ in the variables age, sex, ethnicity, body mass index (BMI) and smoking when compared to controls. As the median disability in this cohort of patients was 3.0, this value was used as the cut-off to categorize the MS patients for this article, as mild disability (EDSS  $\leq$ 3.0) and moderate/high disability (EDSS  $>$ 3.0). MS patients showed higher levels of TGF- $\beta$ 1 and IL-10 than controls ( $p < 0.001$ ). The multivariate GLM analysis with TGF- $\beta$ 1 and IL-10 as dependent variables and diagnosis as the explanatory variable adjusting for age, sex, BMI, ethnicity, and smoking, we found that MS diagnosis, age and, smoking had significant effects on the levels of TGF- $\beta$ 1 and IL-10, whereas sex, BMI, and ethnicity did not. Tests for between-subject effects showed that MS diagnosis was positively associated with the TGF- $\beta$ 1 and IL-10 levels and exerted an effect size of 40.3% and 32.5%, respectively, in their levels. The distribution of the CC, CA and AA genotypes in codominant, dominant and recessive models as well as the A allele differed from female MS patients and female controls and were associated with MS susceptibility. In the dominant model, the frequency of CA + AA genotypes in female MS patients was higher than in healthy female, with an odds ratio (OR) of 2.57 [confidence interval (CI) 95%: 1.50-4.37]. TGF- $\beta$ 1 (OR 1.026, CI 95%: 1.001-1.053,  $p = 0.045$ ) and moderate/high disability (EDSS  $>$ 3) (OR 2.678, CI 95%: 1.026-6.955,  $p = 0.044$ ) were positively associated with the genotype CA+AA. Adjusting for age, ethnicity, smoking, age of diagnosis and MS treatment in the model, only TGF- $\beta$ 1 remained positively associated with the genotypes CA+AA. (OR: 1.027, CI 95%: 1.001-1.054,  $p = 0.043$ ). **Conclusion:** In conclusion, the results demonstrated in the first article showed that the Th17/Treg ratio coupled with age and increased carbonyl proteins were the most important biomarkers associated with disability followed by homocysteine and LDL/HDL ratio. Our results also demonstrated that rs3761548 *FOXP3* variant was associated with MS diagnosis in female patients; moreover, among female MS patients, the CA+AA genotypes were associated with higher levels of TGF- $\beta$ 1 than those with the CC genotype. These data suggest that the A allele of *FOXP3* -3279 C>A variant may exert a role in the suppressor Treg cells function, which could be one of the factors involved in susceptibility in females to MS. Taken together, these results underscore that immune-inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress, and genetic pathways play a key role in the pathophysiology and clinical course of the MS and may be possible new targets for the treatment of these patients.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Disability. Inflammation. Oxidative stress. rs3761548 genetic variant. *FOXP3*. TGF- $\beta$ 1.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Prevalência da esclerose múltipla no mundo por 100.00 habitantes.....	19
<b>Figura 2</b>	Formas clínicas da esclerose múltipla .....	20
<b>Figura 3</b>	Eventos patológicos e reparadores no curso clínico da esclerose múltipla associados com a idade .....	23
<b>Figura 4</b>	Mecanismos envolvidos na imunopatogenia da esclerose múltipla.....	28
<b>Figura 5</b>	Gene <i>FOXP3</i> e principais variantes de um único nucleotídeo.....	31
<b>Figura 6</b>	O papel da homocisteína na sobrevivência e morte neuronal .....	36
<b>Figura 7</b>	Mecanismos de ação dos principais medicamentos utilizados no tratamento da esclerose múltipla .....	42
<b>Figura 8</b>	Consenso brasileiro para o tratamento da esclerose múltipla .....	43
<b>Figura 9</b>	Linha do tempo do desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da esclerose múltipla .....	44
<b>Figura 10</b>	Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata para leitura dos genótipos do rs3761548 <i>FOXP3</i> -3279 C>A.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AOPP	<i>Advanced oxidation protein products</i> - Produtos avançados de oxidação proteica
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHE	Barreira hematoencefálica
CIS	<i>Clinicaly isolated syndrome</i> – Síndrome clinicamente isolada
CLEC16A	Membro A da família do domínio 16 da lectina tipo C
CL-LOOH	<i>T-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> – Quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido
CLT	Linfócitos T citotóxicos
CCL3	Ligante 3 de quimiocina CC
CCL4	Ligante 4 de quimiocina CC
CCL5	Ligante 5 de quimiocina CC
CCR5	Receptor 5 da quimiona CC
CXCL1	Ligante 1 de quimiocina CXC
CXCL6	Ligante 6 de quimiocina CXC
DCV	Doença cardiovascular
DNA	<i>Desoxiribonuclei acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> – Escala Expandida do Estado de Incapacidade
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos

GSH	<i>Glutathione reduced</i> - Glutathiona reduzida
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> – Estudos genômicos amplos de associação
HDL	<i>High-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> – Antígeno leucocitário humano
HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> – Molécula de adesão intercelular 1
IFN	<i>Interferon</i> – Interferon
IL	<i>Interleukin</i> – Interleucina
IL2RA	Receptor alfa da IL-2
IL7RA	Receptor alfa da IL-7
IMC	Índice de massa corpórea
IM&NO	<i>Immune-inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress</i> – Imune-inflamatório, metabólico, estresse oxidativo e nitrosativo
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
iTreg	Célula T regulatória induzida
LAC	Laboratório de análises clínicas
LB	Linfócito B
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LFA1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i> – Antígeno associado à função de linfócitos 1
LMP	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
Ln	<i>Logarithmic</i> – Logaritmo
LT	Linfócito T
MBP	<i>Myelin basic protein</i> – Proteína básica da mielina
MCP-1	proteína quimiotática de monócito 1
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> – Complexo maior de histocompatibilidade
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófago 2
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> – Metaloproteinases de matriz

MØ	Macrófago
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> - Glicoproteína de mielina de oligodendrócitos
mRNA	<i>Messenger ribonucleotide acid</i> – Ácido ribonucleotídeo mensageiro
MS	<i>Multiple sclerosis</i> – Esclerose múltipla
MSIF	<i>Multiple Sclerosis International Federation</i> – Federação Internacional da esclerose Múltipla
MSSS	<i>Multiple Sclerosis Severity Score</i> - Escores de gravidade da esclerose múltipla
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Fator nuclear <i>kappa B</i>
NK	<i>Natural killer cells</i> – Células matadoras naturais
NO	<i>Nitric oxide</i> – Óxido nítrico
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrite – Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrate – Nitrato
Nrf2	Fator nuclear tipo 2
nTreg	Célula T regulatória natural
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	<i>Peroxynitrite</i> – Peroxinitrito
OR	<i>Odds ratio</i> – razão de chance
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PC	Plasmócito
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
RMN	Ressonância magnética nuclear
rpm	Rotações por minuto
S1P	Esfingosina 1 fosfato
SH	Sulfidril
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SNV	<i>Single nucleotide variant</i> – Variante de um único nucleotídeo

SUS	Sistema Único de Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TCR	<i>T cell receptor</i> – Receptor de célula T
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i> – Fator de transformação do crescimento beta
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th	<i>T helper</i> – T auxiliadora
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i> – Parâmetro antioxidante total do plasma
Treg	Linfócito T regulador
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VCAM1	<i>Vascular cellular adhesion molecule 1</i> – Moléculas de adesão celular vascular 1
VLA4	<i>Very late antigen 4</i> – Antígeno muito tardio 4
XC	Xileno cianol

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	24
1.1.1	Imunopatogênese da Esclerose Múltipla.....	26
1.1.2	Variante genética do <i>FOXP3</i> -3279 C>A (rs3761548) .....	30
1.1.3	Estresse Oxidativo na Esclerose Múltipla .....	33
1.1.4	Homocisteína e Esclerose Múltipla .....	35
1.1.5	Alterações Metabólicas na Esclerose Múltipla .....	37
1.2	TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA .....	39
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	45
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	Objetivo Geral .....	46
3.2	Objetivos Específicos.....	46
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	47
4.1	Aspectos Éticos.....	47
4.2	Delineamento.....	47
4.3	POPULAÇÃO .....	47
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	47
4.5	AMOSTRA .....	48
4.6	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO .....	49
4.7	DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS, IMUNOLÓGICOS E METABÓLICOS .....	49
4.8	MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	50
4.9	VARIANTE RS3761548 DO GENE <i>FOXP3</i> .....	51
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	56
5.1	ARTIGO 1.....	57
5.2	ARTIGO 2.....	94

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>123</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>124</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>125</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>125</b>
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.....	138
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>139</b>
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	140
	APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO .....	142

## 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 e mecanismos de reparo. A EM é uma doença complexa e de etiologia multifatorial, causada pela interação entre fatores genéticos, falha da tolerância imunológica e fatores ambientais (SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

A lesão característica da EM é a placa desmielinizante, formada por áreas desmielinizadas confluentes na substância branca e cinzenta do cérebro e da medula espinhal, indicando a apoptose dos oligodendrócitos. Essas lesões são causadas pela infiltração de células imunes através da barreira hematoencefálica (BHE) que promovem inflamação, desmielinização, gliose e degeneração neuroaxonal, levando à ruptura da sinalização neuronal (FRISCHER et al., 2009). As células T aparecem precocemente na formação da lesão e a doença é considerada autoimune, iniciada por linfócitos T (LT) autorreativos que produzem respostas exacerbadas a autoantígenos do SNC, cuja natureza precisa, no entanto, permanece desconhecida (FRISCHER et al., 2009).

Na maioria dos casos, as manifestações iniciais da EM ocorrem entre os 20 e 40 anos de idade, sendo duas a três vezes mais frequente em mulheres e em indivíduos caucasianos (COMPSTON; COLES, 2008; OH; VIDAL-JORDANA; MONTALBAN, 2018) e a maior causa de incapacidade neurológica em adultos jovens (REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018).

De acordo com o último atlas geográfico de EM realizado no ano de 2013, o número estimado de pessoas com EM em todo o mundo é de, aproximadamente, 2,5 milhões (BROWNE et al., 2014; REICH; LUCCHINETTI; CALABRESI, 2018). 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 (BROWNE et al., 2014).

Estima-se que vários países da América do Sul, apresentam risco médio para EM, com prevalência de 5 a 20 casos por 100.000 habitantes. A prevalência da EM na Argentina,

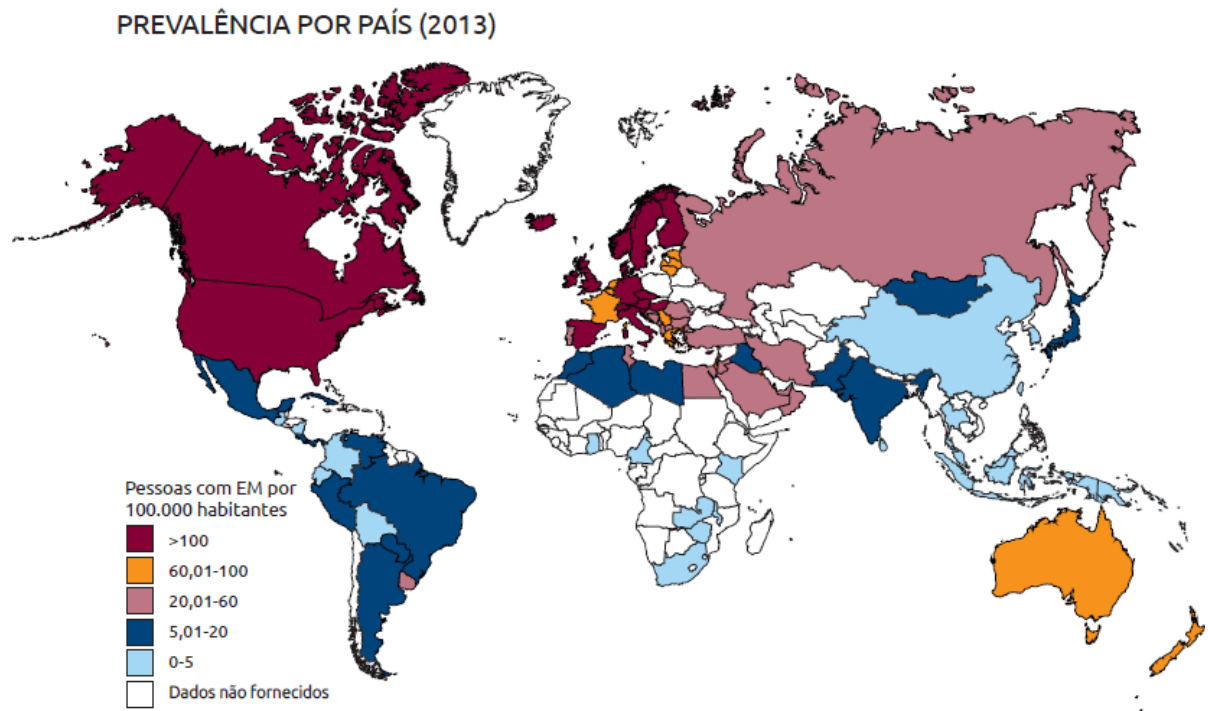
considerado um país de risco médio para a EM, é estimada de ser 18 por 100.000 habitantes, o que é seis vezes mais alta do que a prevalência registrada no Equador, um país com risco baixo para EM (EVANS et al., 2013).

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. O primeiro estudo, na cidade de São Paulo, São Paulo, apresentou uma taxa de prevalência de 4,3 por 100.000 habitantes (CALLEGARO et al., 1992). Uma reavaliação da epidemiologia de EM mostrou uma taxa de prevalência de 15,0 por 100.000 (CALLEGARO et al., 2001). Outra investigação de prevalência, realizada em Botucatu, São Paulo, revelou uma taxa de 17 casos por 100.000 habitantes (ROCHA et al., 2002). No Estado de Minas Gerais, 2 outros estudos foram realizados e a taxa de prevalência foi de 12,5 por 100.000 habitantes em Uberaba (RIBEIRO, 2011) e de 18,2 por 100.000 habitantes em Belo Horizonte (LANA-PEIXOTO et al., 2012). Em Santa Maria, Rio Grande do Sul, estudo mostrou prevalência de 27,2 por 100.000 habitantes, a maior taxa relatada no Brasil (FINKELSZTEJN et al., 2014).

Em Londrina, cidade no norte do estado do Paraná, região sul do Brasil, estudos prévios demonstraram uma taxa de 12,9 por 100.000 habitantes (KAIMEN-MACIEL; MEDEIROS, 2003). 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. De acordo com dados do Ministério da Saúde, 35 mil brasileiros convivem com a EM e, destes, 15 mil estão em tratamento pelo Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2019).

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 (KOCH-HENRIKSEN; SØRENSEN, 2010). A figura 1 apresenta a prevalência da EM no mundo, segundo a *Multiple Sclerosis International Federation* (2013).

**Figura 1** Prevalência da esclerose múltipla no mundo por 100.00 habitantes



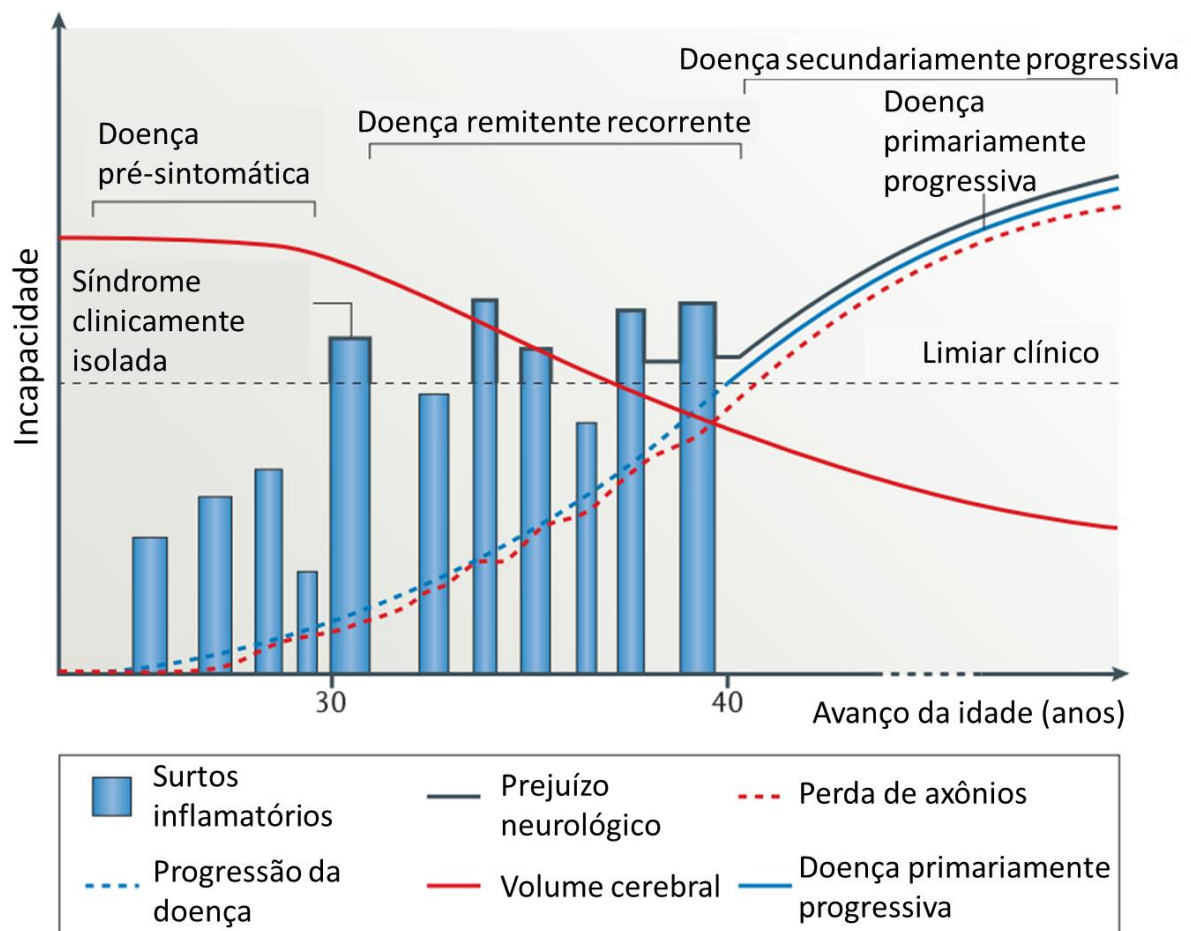
Fonte: *Multiple Sclerosis International Federation*. Atlas da Esclerose Múltipla em 2013: mapeamento da esclerose múltipla no mundo. Disponível em <http://abem.org.br/esclerose/atlas-da-esclerose-multipla-2013>. Acessado em 02/04/2019.

A EM é uma doença heterogênea do ponto de vista clínico, uma vez que os pacientes podem apresentar uma grande variedade de sintomas, 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 (MILO; MILLER, 2014).

De acordo com a classificação recentemente revisada do curso clínico da EM, há quatro fenótipos principais: síndrome clinicamente isolada (CIS), EM remitente-recorrente (EMRR), EM primariamente progressiva (EMPP) e EM secundariamente progressiva (EMSP) (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; THOMPSON et al., 2018a). A forma CIS é a manifestação inicial 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, 2015). 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. Aproximadamente 10% dos pacientes com EM são diagnosticados com a forma EMPP e apresentam-se com o curso progressivo desde o início dos sintomas e evoluem de forma lenta e estável, sem surtos aparentes (MARQUES, 2010). A figura 2 ilustra as principais formas clínicas da EM.

**Figura 2** Formas clínicas da esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de Dendrou; Fugger; Friese (2015).

O diagnóstico da EM é baseado na integração de achados clínicos, de imagem e laboratoriais. No entanto, o 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) auxilia na exclusão de 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 McDonald de 2017, houve o restabelecimento do exame eletroforético 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).

O grau de incapacidade da doença é avaliado pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale, EDSS*), proposta por Kurtzke (1983), que é parcialmente baseada em avaliações de oito áreas do SNC conhecidas como sistemas funcionais (funções piramidais, tronco cerebral, cerebelar, sensoriais, intestinais, vesicais, cerebrais e visuais). 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. 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 ≥6,0 um agravamento de, pelo menos, meio ponto é necessário para ser considerado como progressão da incapacidade (KOCH et al., 2007).

A progressão da incapacidade também pode ser avaliada pelo  $\Delta$ EDSS, ou seja, pela variação entre os escores de EDSS obtidos em intervalos de tempo (EDSS no tempo 2 - EDSS no tempo 1 =  $\Delta$ EDSS). Atualmente, o escore de gravidade da esclerose múltipla (*Multiple Sclerosis Severity Score, MSSS*) tem sido considerado como o melhor método para avaliação do acúmulo de incapacidade na EM ao longo do tempo (KOCH et al., 2015). 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).

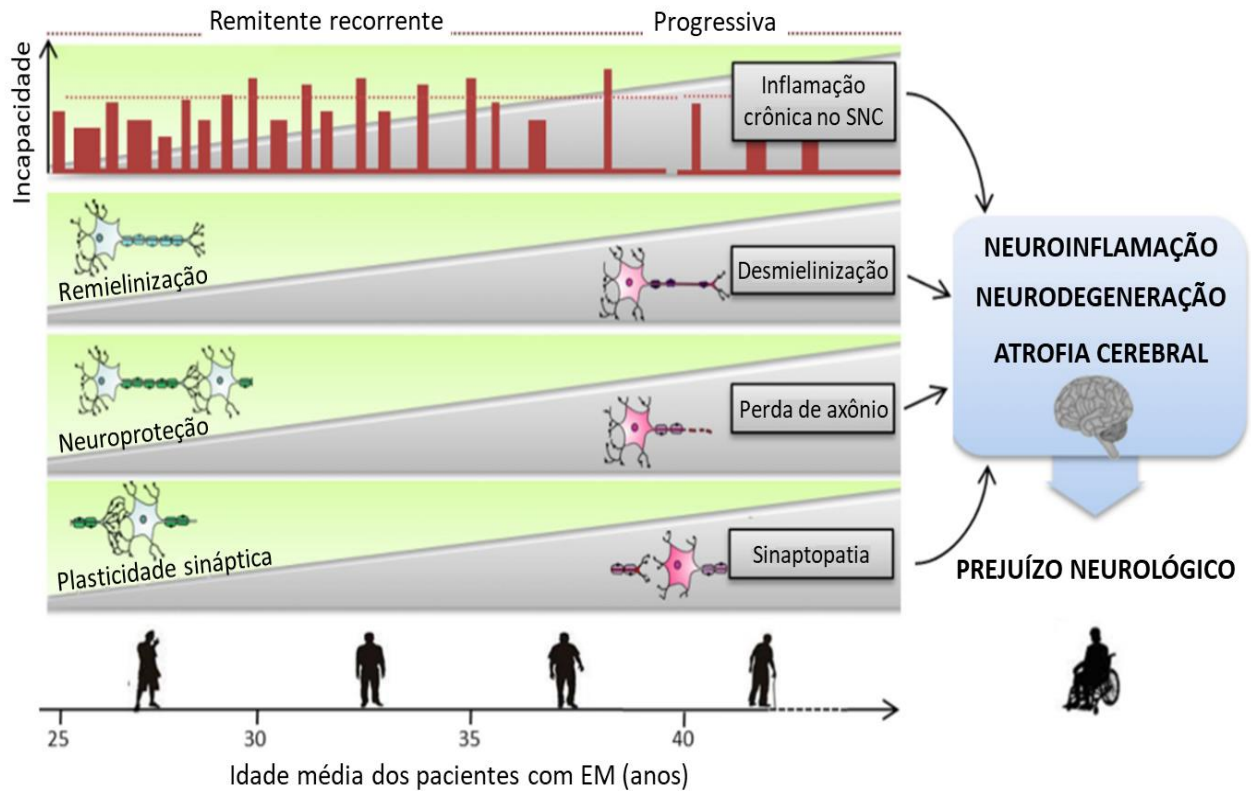
Além disso, alguns fatores estão relacionados com o pior prognóstico da EM e podem ser considerados preditores do acúmulo da incapacidade (Quadro 1). Entre estes fatores, o avanço da idade é um fator de risco significativo associado com a neuroinflamação e com o curso clínico da EM (MUSELLA et al., 2018). Estudos sugerem que os processos de envelhecimento afetam diferencialmente o desempenho motor e cognitivo em pacientes com EM (BODLING; DENNEY; LYNCH, 2009; ROY et al., 2017), indicando que os pacientes com EM mais idosos são mais suscetíveis à deficiência motora e menos à disfunção cognitiva. Na figura 3 estão descritos a sequência de eventos patológicos e reparadores que ocorrem durante o curso clínico da doença associados com a idade.

**Quadro 1** Fatores associados ao pior prognóstico em pacientes com esclerose múltipla

<b>Fatores associados ao pior prognóstico em pacientes com esclerose múltipla</b>
- Localização das lesões no sistema nervoso central (esfincteriano, motor, cerebelar, tronco-cerebral)
- Incapacidade inicial ( <i>baseline</i> )
- Lesões na ressonância magnética <ul style="list-style-type: none"> <li>- Presença de duas ou mais lesões gadolíneo-positivas em T1</li> <li>- Presença de duas ou mais lesões em T2</li> <li>- Aumento do número e tamanho das lesões</li> <li>- Presença de duas ou mais lesões medulares</li> </ul>
- Atrofia cerebral
- Idade mais avançada
- Elevado número de surtos nos dois primeiros anos de doença
- Surto multifocais
- Gravidade dos surtos <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tempo de recuperação dos surtos</li> <li>- Grau de recuperação após surto</li> </ul>
- Sexo masculino
- Descendente afro-americano

Fonte: Adaptado de Thompson et al. (2018a).

**Figura 3** Eventos patológicos e reparadores no curso clínico da esclerose múltipla associados com a idade



Com o avanço da idade do paciente com esclerose múltipla (EM), processos neurodegenerativos e neuroinflamatórios são exacerbados, causando déficits cognitivos e motores graves. A inflamação está presente em todos os estágios da doença. Desde a fase inicial da EM remitente-recorrente (EMRR) ocorre desmielinização, sinaptopatia e dano axonal, causando neurodegeneração progressiva. Para evitar danos cerebrais e compensar funcionalmente eventuais déficits de estímulos sinápticos, o sistema nervoso central (SNC) utiliza mecanismos de neuroproteção, remielinização e plasticidade sináptica. A transição da EMRR para a EM secundariamente progressiva (EMSP) é, provavelmente, o ponto no qual a reserva compensatória de plasticidade cerebral que contorna a lesão neuronal, está esgotada. Com o avanço da idade, o poder de remielinização, neuroproteção e plasticidade sináptica diminuem, independentemente do curso e gravidade da doença.

Fonte: Adaptado de Musella et al. (2018).

## 1.1 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A etiologia da EM ainda não está totalmente elucidada. Evidências sugerem que a interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais com fatores de risco modificáveis estejam envolvidos com a patogênese da doença (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016). 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 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, dislipidemia, latitude geográfica (em geral a exposição ao sol e raios ultravioleta B tendem a diminuir com o aumento da latitude), deficiência de vitamina D e infecções virais, principalmente envolvendo o vírus Epstein-Barr (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). Além disso, pesquisas indicam que altos níveis de homocisteína podem ser um fator de risco para condições neurodegenerativas (SESHADRI, 2006; ZHU; HE; LIU, 2011), sendo associados com progressão da incapacidade (OLIVEIRA et al., 2018) e prejuízo cognitivo em pacientes com EM (RUSSO et al., 2008).

Com relação a contribuição genética na EM, sabe-se que a variação gênica é responsável por aproximadamente 30% do risco global de EM e, com o advento de estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide association studies*, GWAS), mais de 100 variantes genéticas foram identificadas como fatores de risco para o desenvolvimento da EM (BEECHAM et al., 2013; SOSPEDRA; MARTIN, 2016). Cada variante genética teria um pequeno efeito no risco da doença e diferentes combinações dessas variantes provavelmente contribuem para a suscetibilidade em diferentes pacientes (SOSPEDRA; MARTIN, 2016). A maioria dessas variantes codifica moléculas envolvidas no sistema imunológico, tais como os genes *Human leukocyte antigen (HLA)* no cromossomo 6,

incluindo variantes 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; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015).

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 suscetibilidade 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). Outro estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a variante do fator de necrose tumoral (TNF)- $\beta$  +252 G>A (rs909253) foi associado com a EM independente dos alelos do *HLA-DRB1* (KALLAUR et al., 2014) e desempenha um papel na fisiopatologia da EM e progressão da doença (KALLAUR et al., 2017).

Embora o locus *HLA-DRB1* localizado no cromossomo 6p21 seja o mais importante para a suscetibilidade genética à EM (SCHMIDT; WILLIAMSON; ASHLEY-KOCH, 2007), ele não explica completamente a base genética desta doença e responde por menos de 50% do componente genético na EM (COMPSTON; COLES, 2002). Muitos genes não HLA têm sido sugeridos na associação com EM, mas poucos têm mostrado reprodutibilidade em diferentes populações (BAHREINI et al., 2010). Bahreini et al. (2010) revisaram as principais variantes de um único nucleotídeo (*Single Nucleotide Variant, SNV*) associados à EM e destacaram variantes no gene do receptor alfa da interleucina 2 (*IL2RA*), gene do receptor alfa da interleucina 7 (*IL7RA*) e do membro A da família do domínio 16 da lectina tipo C (*CLEC16A*).

A deleção de 32 pares de bases do gene do receptor 5 da quimiocina CC (*CCR5 $\Delta$ 32*) foi associada com menor número de lesões gadolíneo-positivas avaliadas por RMN em pacientes com EM (KAIMEN-MACIEL et al., 2007). Além disso, outras variantes em genes de citocinas e seus receptores, como por exemplo o gene da interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , receptor da IL-1 $\beta$  e receptor da IL-2, quimiocinas (CCL3, CCL4 e CCL5) e receptores de quimiocinas (CCR2) foram revisados quanto ao seu papel na suscetibilidade e curso clínico da EM (KALLAUR et al., 2011).

### 1.1.1 Imunopatogênese da Esclerose Múltipla

A EM inicia como uma resposta imune celular mediada por LT. A ativação dos LT CD4<sup>+</sup> autorreativos que escaparam dos mecanismos de tolerância central e periférica. Indivíduos geneticamente suscetíveis 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 (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 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 LT CD4<sup>+</sup> *naïves* no tecido periférico, implicando em sua ativação (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; RODGERS; MILLER, 2012). Estes linfócitos ativados podem se diferenciar em vários subtipos de células funcionalmente distintas incluindo *T helper* (Th)1, Th2, Th17 e células Treg (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015; RODGERS; MILLER, 2012). Além disso, linfócitos B (LB) autorreativos também desempenham um papel fundamental nos danos causados na EM, participando da produção de anticorpos contra proteínas da mielina, como o anti-MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*) e anti-MBP (*myelin basic protein*), produzindo citocinas efetoras e contribuindo para a ativação de LT CD4<sup>+</sup> através da apresentação de antígenos via MHC II no SNC (DUDDY et al., 2007; FRANCIOTTA et al., 2008).

Na EM, o processo inflamatório crônico responsável pela neurodegeneração e destruição da mielina é caracterizado pelo predomínio de uma resposta imune de células CD4<sup>+</sup> Th1 e Th17 (MURPHY et al., 2010; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). As células autorreativas produzidas na periferia têm a capacidade de entrar no SNC através da BHE, onde persistem e geram uma cascata inflamatória, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), levando a formação de lesões e déficits neurológicos (SOSPEDRA; MARTIN, 2005).

Os mecanismos envolvidos no aumento da permeabilidade da BHE ainda não estão totalmente esclarecidos, no entanto, a ativação da micróglia e a produção de uma grande variedade de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$  e IL-6, podem afetar a permeabilidade da BHE (RODGERS; MILLER, 2012). Além disso, a ativação do LT CD4<sup>+</sup> induz a expressão de moléculas de adesão em sua superfície com o antígeno muito tardio 4 (VLA4) e o antígeno associado à função de linfócitos 1 (LFA1). A BHE passa a expressar moléculas de

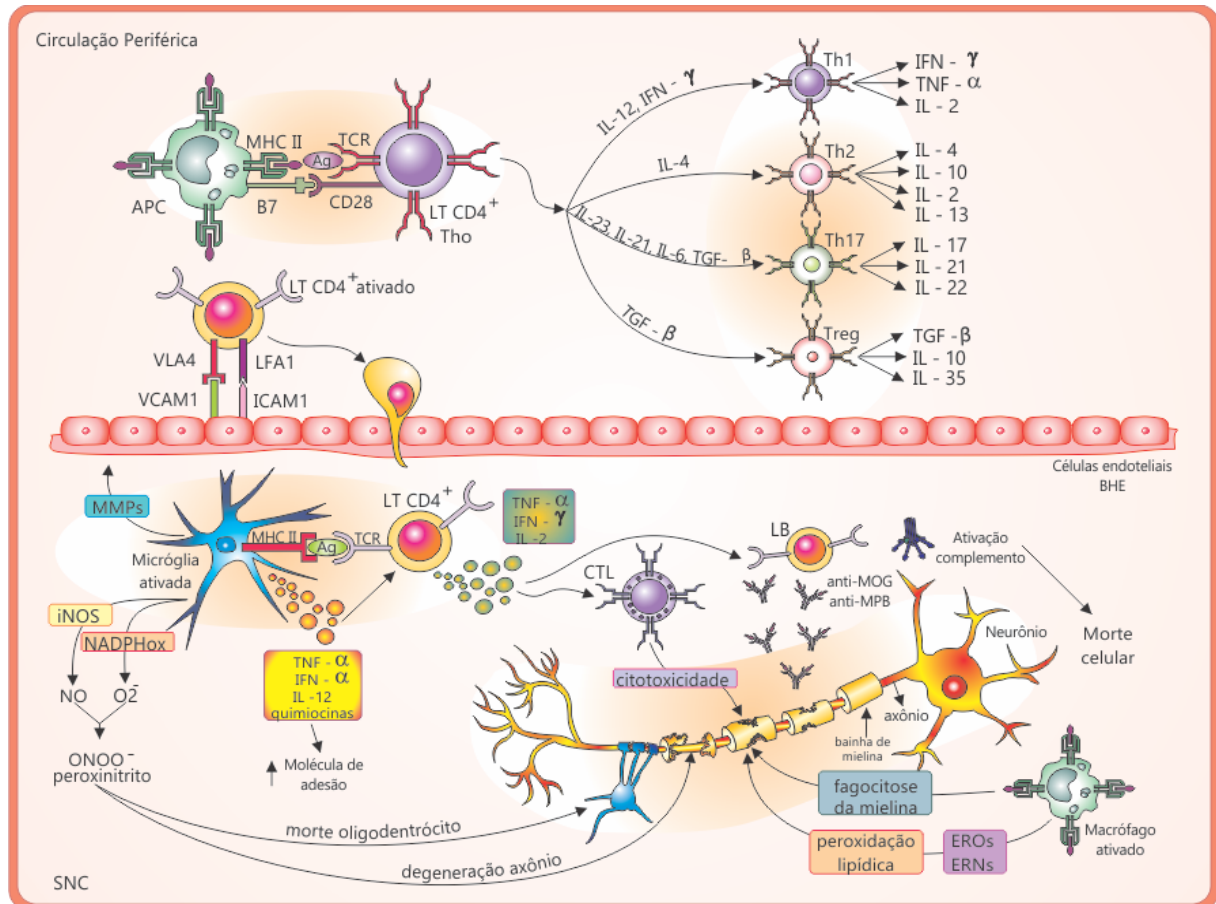
adesão celular vascular 1 (VCAM1) e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM1). A interação do VLA4 com a VCAM1 e do LFA1 com a ICAM1 permite a entrada dos LT CD4<sup>+</sup> no SNC (HARTUNG et al., 1995; KALINOWSKA-ŁYSZCZARZ et al., 2016). Na figura 4 estão descritos os mecanismos envolvidos na imunopatogenia da EM.

A micróglia apresenta antígenos via MHC classe II para os LT CD4<sup>+</sup> que adentraram o SNC, reativando estas células (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015). Além disso, a micróglia ativada produz citocinas inflamatórias, quimiocinas e metaloproteinases (MMPs). As citocinas e quimiocinas irão aumentar a expressão de moléculas de adesão na BHE e ativar LT CD4<sup>+</sup>, enquanto que as MMPs irão auxiliar na degradação da BHE permitindo a entrada de mais LT no SNC. Os LT CD4<sup>+</sup> ativados produzem citocinas como TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)-  $\gamma$  e IL-2 que irão ativar a resposta citotóxica e humoral. Os LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos agridem a bainha de mielina, enquanto que a imunidade humoral irá produzir anticorpos contra componentes da mielina, que ativam as proteínas do sistema complemento, contribuindo para a lesão da bainha de mielina (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias estão associados a mudanças na atividade da doença na EM (GRABER et al., 2007; KALLAUR et al., 2013). Inicialmente, mecanismos inflamatórios da resposta adaptativa eram atribuídos às citocinas liberadas pelas células Th1. Posteriormente, verificou-se que, além dos efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  produzidos pelas células Th1, a IL-17 produzida pelas células Th17 também desempenha um papel crítico na patogênese da EM, afetando a degradação da BHE, induzindo a infiltração de células imunes no compartimento do SNC, amplificando respostas inflamatórias e gerando mediadores citotóxicos que resultam em desmielinização e dano neuronal (KOLBINGER et al., 2016).

A IL-17 aumenta a expressão de mediadores inflamatórios, incluindo IL-8, ligante 1 de quimiocina CXC (CXCL1), ligante 6 de quimiocina CXC (CXCL6), IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF), proteína inflamatória de macrófago 2 (MIP-2), proteína quimioatática de monócito 1 (MCP-1) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), induzindo a infiltração de neutrófilos no SNC e contribuindo para a inflamação (JOVANOVIC et al., 1998).

**Figura 4** Mecanismos envolvidos na imunopatogenia da esclerose múltipla



Macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos com epítomos semelhantes à mielina aos linfócitos T  $CD4^+$  *naïves* (Th0) que, após ativadas, podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e T reguladora (Treg). Os Th1 ativados ligam-se às células endoteliais por meio das moléculas de adesão (VLA4 se liga à VCAM-1 e LFA1 se liga à ICAM-1), facilitando a entrada destas células no SNC através da barreira hematoencefálica (BHE). No parênquima nervoso, um novo contato ocorre entre as células T  $CD4^+$  e macrófagos ou micróglia. Nesta fase de reativação, a micróglia torna-se ativada e produz grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-12, quimiocinas, metaloproteínas de matriz (MMPs) e aumento da expressão de moléculas de adesão. Ocorre aumento da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido, respectivamente. Estas duas moléculas levam à formação de peroxinitrito que é um potente oxidante envolvido na lesão dos oligodendrócitos e axônios na EM. LT  $CD4^+$  ativados produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  que estimulam linfócitos B na produção de anticorpos contra a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (anti-MOG) e anticorpo contra a proteína básica de mielina (anti-MBP), que fixam o complemento levando à morte celular. Estas citocinas também estimulam linfócitos T citotóxicos (CTL) que agem diretamente nas lesões desmielinizantes. Os macrófagos perivascularmente ativados também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) que reagem com lipídeos poli-insaturados causando peroxidação lipídica e fagocitose da mielina. Todos estes mecanismos contribuem para o processo de desmielinização na EM.

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2014).

Apesar disso, nem todos os aspectos da inflamação são deletérios ao SNC, uma vez que vários componentes da resposta inflamatória possuem efeitos neuroprotetores. Estudos têm demonstrado que oligodendrócitos e micróglia expressam constitutivamente receptores para citocinas, principalmente do tipo Th2 (CANNELLA; RAINE, 2004). A expressão de *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) e IL-10 está associada com recuperação da doença na encefalomielite experimental autoimune (EAE), o principal modelo animal utilizado para estudar a EM *in vivo* (BEGOLKA et al., 1998), além disso, neurônios expressam TGF- $\beta$  (ISSAZADEH et al., 1996). *In vitro*, o TGF- $\beta$  parece inibir a ativação da caspase-3 e a apoptose neuronal (DEIGNER; HABERKORN; KINSCHERF, 2000). Por outro lado, um aumento na expressão de TGF- $\beta$  aumenta astrogliose e a infiltração de monócitos, resultando em uma EAE mais grave com início precoce quando comparado a controles (WYSS-CORAY et al., 1997). A IL-10 parece diminuir a resposta imune na EAE e ter efeitos neuroprotetores (BETTELLI et al., 1998). Deste modo, citocinas Th2 parecem desempenhar um papel protetor na sobrevivência e diferenciação de neurônios e oligodendrócitos no SNC durante o processo de dano e desmielinização (MARCHIONNI et al., 1999).

No entanto, dependendo do microambiente, o TGF- $\beta$  podem influenciar a diferenciação dos LT CD4<sup>+</sup> *naïves* em duas populações diferentes de células Th CD4<sup>+</sup>. O TGF- $\beta$  induz a diferenciação da célula T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> em Treg, enquanto que na presença de IL-6 promove a diferenciação de LT CD4<sup>+</sup> *naïves* em células Th17 (LEE; SEVERIN; LOVETT-RACKE, 2017). Além disto, a sinalização via TGF- $\beta$  é vital para a diferenciação e função das células Tregs (LEE; SEVERIN; LOVETT-RACKE, 2017). Com isso, outra hipótese que tem sido estudada para avaliar a predisposição à EM é a perda da tolerância imunológica das células T autorreativas que circulam em baixos níveis pelo organismo (SAKAGUSHI, 2000; IRANI, 2005).

As células Treg desenvolvem um importante papel no controle das células T autorreativas, fazendo a supressão dessas células. Originalmente descrita como Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, as células Treg exercem um papel essencial na prevenção de autoimunidade e na manutenção da homeostasia imunológica, assim como no controle da resposta de células T (ODA et al., 2013). Embora as células Treg expressem vários marcadores, o *forkhead box P3* (FOXP3) é o único marcador específico destas células, importante no desenvolvimento de Treg naturais provenientes do timo (nTreg), sendo também necessário para a manutenção

da função supressora das células Treg induzidas (iTreg) que se diferenciam nos órgãos linfoides periféricos (TAVAKOLI et al., 2008).

Estudos *in vivo*, demonstraram que a diminuição das células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> leva ao início da doença autoimune em ratos (SAKAGUSHI, 2000; IRANI, 2005). Na EM, foram descritos um número reduzido de células Tregs e deficiência de sua atividade (HAAS et al., 2005). Portanto, há ampla evidência de que as células Treg, que se caracterizam pela secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ , são importantes para o controle de mecanismos pró-inflamatórios em modelos animais de doenças autoimunes.

### 1.1.2 Variante genética do *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548)

Variantes em genes que alteraram a resposta imunológica podem estar envolvidos na suscetibilidade à EM, sendo o gene *FOXP3* um bom candidato devido sua expressão em células Treg. Como visto anteriormente, as células Treg são responsáveis pela regulação e manutenção da homeostase imunológica, e defeitos na diferenciação e função destas células estão relacionados à maior suscetibilidade às doenças autoimunes e infecciosas.

O gene *FOXP3* contém 11 éxons e está localizado no braço curto (p) do cromossomo X (Xp11.23), uma região relacionada à doenças autoimunes (ORTONA et al., 2011; PEREIRA et al., 2017). Este gene codifica a proteína FOXP3, um importante marcador das células Treg e sua expressão em células T CD4<sup>+</sup> *naïves* diferencia estas células no fenótipo Treg. Sendo assim, o FOXP3 é um regulador crucial do desenvolvimento e da função das células Treg (BLUESTONE; ABBAS, 2003; DING; XU; BROMBERG, 2012). A perda da expressão deste fator diminui a capacidade reguladora das Tregs, tanto em número como em sua função (BLUESTONE; ABBAS, 2003).

Os mecanismos de controle da expressão de FOXP3 nas células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ainda não está totalmente elucidado. A expressão de FOXP3 é regulada por mecanismos complexos, podendo ser induzida em células T efectoras que não possuem atividade supressora, por meio da ativação simultânea de múltiplos fatores de transcrição. Essa ativação ocorre através de receptores de células T (TCR) e receptores de citocinas, incluindo o receptor do TGF- $\beta$  (ALLAN et al., 2007; TONE; GREENE, 2011).

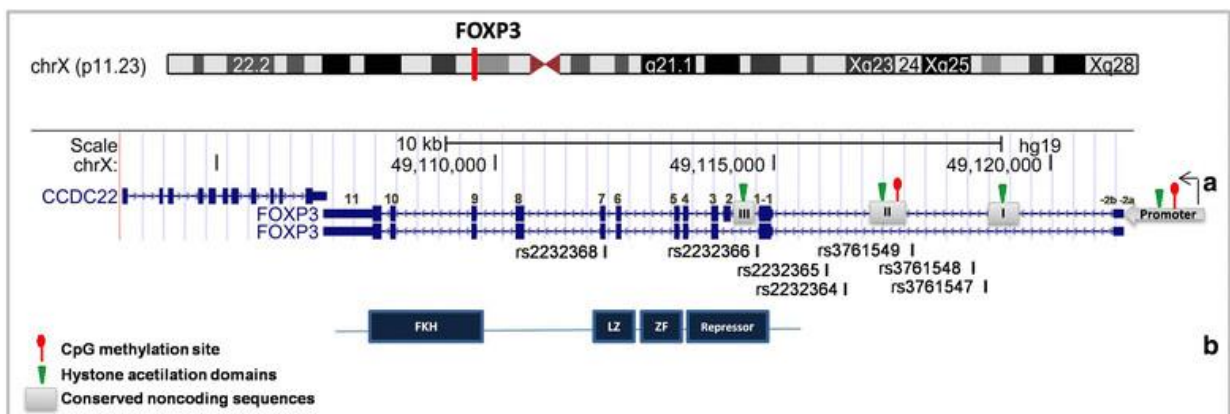
Os SNVs têm sido descritos em várias regiões no gene *FOXP3*, tais como regiões promotora, intrônica e exônica, e podem alterar a expressão e função do FOXP3, sugerindo

que estas variantes podem exercer um papel no desenvolvimento ou manutenção de doenças autoimunes (GAO et al., 2010; HE et al., 2013). Além disso, os SNVs no gene *FOXP3* podem influenciar os microRNAs, estrutura e atividade da proteína codificada ou *splicing* do gene (MARQUES et al., 2015).

Uma região crítica para a iniciação e a regulação da transcrição do *FOXP3* é a sequência conservada promotora de seu gene, região onde a variante rs3761548 foi identificada e tem sido descrito que pode alterar a expressão do *FOXP3*. A presença do genótipo AA impede a fixação de certos fatores de transcrição inibindo a transcrição do *FOXP3* (SHEN et al., 2010). A figura 5 demonstra o gene *FOXP3* e seus principais SNVs.

Vários estudos associaram a variante rs3761548 do gene *FOXP3* ao risco e prognóstico de doenças multifatoriais como a psoríase (GAO et al., 2010), tireoidite autoimune (INOUE et al., 2010), rinite alérgica (ZHANG et al., 2009), vitiligo (JAHAN et al., 2013), artrite reumatoide (HASHEMI et al., 2018) e EM (EFTEKHARIAN, et al. 2015; JAFARZADEH, et al. 2014). Além disso, um estudo de meta análise encontrou associação deste SNV com várias doenças autoimunes (HE et al., 2013). Hashemi et al. (2018) demonstraram que a presença do genótipo AA da variante rs3761548 no *FOXP3* em pacientes com artrite reumatoide diminui a quantidade de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> quando comparada aos genótipos CC e CA. No entanto, poucos estudos avaliaram as variantes genéticas do *FOXP3* com a suscetibilidade à EM e estão descritos na Tabela 1. Diante desse cenário, fica evidente a importância de se avaliar SNVs no gene *FOXP3* que possam estar envolvidos na variabilidade da resposta regulatória de células T autorreativas e tolerância imunológica, e assim associados à suscetibilidade genética à EM.

**Figura 5** Gene *FOXP3* e principais variantes de um único nucleotídeo



Fonte: adaptado de Marques et al. (2015).

**Tabela 1** Variantes genéticas na região promotora do *FOXP3* avaliados em pacientes com esclerose múltipla (EM)

Amostra	País	dbSNP	Frequência Alélica	Efeito	Referência	
410 EM 446 controles	Irã	rs3761548 rs2232365	-3279 C>A - 924 A>G	Caso: C=0,430/A=0,570 Controle: C=0,540/A=0,460 Caso: G=0,460/A=0,540 Controle: G=0,550/A=0,450	rs3761548: alelo A associado com EM; rs2232365: alelo A associado com EM; Haplótipo A/A também foi associado com EM.	EFTEKHARIAN, et al. 2015.
140 EM 140 controles	Irã	rs3761548	-3279 C>A	Caso: C=0,578/A=0,421 Controle: C=0,728/A=0,271	Alelo A associado com EM; menores níveis de IL-35 na presença do genótipo AA.	JAFARZADEH, et al. 2014.
174 EM 174 controles	Polônia	rs3761547 rs3761548 rs3761549	-3499 A>G -3279 C>A -2383 C>T	Homens Caso: G= 0,180/A=0,820 Controle: G= 0,101/A=0,899 Homens Caso: C=0,620/A=0,380 Controle: C=0,663/A=0,337 Homens Caso: T=0,160/C=0,840 Controle: T= 0,112/C=0,888	Associação do alelo C em homens com EM. Não encontrou associação. Não encontrou associação.	WAWRUSIEWICZ-KURLONEK et al., 2018.

Fonte: autor

### 1.1.3 Estresse Oxidativo na Esclerose Múltipla

Embora a etiologia da EM seja multifatorial, tem sido sugerido que o aumento na produção de EROs e ERNs poderia levar ao aumento da produção de substratos oxidados que contribuem para a desregulação da resposta imunológica e agravam o curso clínico da EM (SAYRE; PERRY; SMITH, 2008). O estresse nitro-oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão de doenças crônicas e autoimunes (DICHI et al., 2014).

Estudos têm sugerido que o estresse oxidativo pode exercer importante papel na patogênese da EM. EROs e ERNs, geradas em excesso pela micróglia ativada, têm sido implicadas como mediadores da desmielinização e podem contribuir para a formação e persistência das lesões características da doença (FERRETTI et al., 2005). O SNC é particularmente susceptível ao estresse oxidativo devido ao elevado consumo de oxigênio, resultando em produção excessiva de EROs, além da alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, os quais são particularmente vulneráveis ao ataque de peroxidação lipídica (FRIEDMAN, 2011). Além disso, o cérebro possui menor defesa antioxidante comparado à outros órgãos, altos níveis de ferro que agem como pró-oxidantes sob condições patológicas, e a ocorrência de reações envolvendo oxidação de dopamina e glutamato no tecido cerebral (ALLEN; BAYRAKTUTAN, 2009).

Estudos prévios evidenciaram aumento dos produtos de peroxidação lipídica no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no plasma de indivíduos com EM (GRECO; MINGHETTI; LEVI, 2000; FERRETTI et al., 2005). Além disso, marcadores de oxidação proteica como os produtos avançados da oxidação proteica (AOPP) e proteínas carbonílicas, mostraram-se elevados em pacientes com EM (LJUBISAVLJEVIC et al., 2013; MOREL et al., 2017; MILLER et al., 2012). Os radicais livres danificam os componentes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos o que resulta em morte celular por necrose ou apoptose (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004). Desta maneira, teoricamente, o tratamento de pacientes com EM com antioxidantes poderia prevenir a propagação do dano tecidual e melhorar o quadro clínico (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004).

A incapacidade dos pacientes com EM, avaliada pelo EDSS, foi associada com o estresse oxidativo, mesmo em fase de remissão clínica (OLIVEIRA et al., 2012). Marcadores do estresse oxidativo como produtos de peroxidação lipídica determinados por método de

quimioluminescência e proteínas carbonílicas apresentaram uma correlação positiva com EDSS, sugerindo que o estresse oxidativo poderia ter um importante papel na fisiopatologia da progressão da doença (OLIVEIRA et al., 2012).

Enquanto a oxidação lipídica tem sido extensivamente estudada em EM, a oxidação proteica tem recebido menos atenção (BIZZOZERO et al., 2005). Proteínas modificadas oxidativamente são responsáveis por perturbações adicionais na tolerância ao próprio porque representam potenciais alvos para o sistema imunológico pela falha da tolerância de células B (SHEIKH et al., 2007). Além das proteínas carbonílicas, os níveis de AOPP são marcadores do estresse oxidativo e encontram-se elevados em plasma de pacientes com doenças crônicas como uremia crônica na doença renal dialítica (WITKO-SARSAT et al., 1996), doença arterial coronariana (KANEDA et al., 2002), diabetes mellitus tipo 2 (PIWOWAR; KNAPIK-KODECKA; WARWAS, 2007, 2009), esclerose sistêmica (SERVETTAZ et al., 2007) e câncer colorretal (CHANG et al., 2008). A formação de AOPP é correlacionada com a concentração de oxidantes clorinados, indicando que AOPP resulta da interação entre oxidantes e proteínas plasmáticas (WITKO-SARSAT et al., 1996).

Ljubisavljevic et al. (2013) demonstraram que pacientes com EM apresentaram níveis mais altos de AOPP medidos no plasma e no LCR, enquanto que os níveis de grupamento sulfidrila (SH) estavam diminuídos, em comparação aos controles. Além disso, os níveis de AOPP no plasma e no LCR foram positivamente correlacionados com o EDSS e o SH foi inversamente correlacionado com o EDSS (LJUBISAVLJEVIC et al., 2013).

Em relação à EM, um estudo avaliou marcadores de oxidação proteica em pacientes com EMRR sem tratamento com imunomoduladores, pacientes com surtos e pacientes tratados com interferon (IFN)- $\beta$  e acetato de glatiramer (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013) e verificaram que os níveis de AOPP foram maiores em pacientes EMRR sem tratamento e em pacientes com surto. Além disso, este estudo mostrou que marcadores de oxidação proteica estão correlacionados com proteína C reativa, sugerindo que as modificações de proteínas estão relacionadas com o processo inflamatório. Os resultados do estudo indicam que ocorre oxidação de proteínas na EM e que marcadores do dano proteico, especialmente, a AOPP, podem ser úteis no monitoramento do estresse oxidativo em pacientes com EM. Portanto, o processo inflamatório crônico está associado ao aumento de estresse oxidativo criando um ambiente de retroalimentação positivo favorecendo a inflamação (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013).

#### 1.1.4 Homocisteína e Esclerose Múltipla

A homocisteína é um aminoácido sulfidrílico não-essencial derivado do metabolismo da metionina dependente de ácido fólico, vitamina B6 e vitamina B12. A homocisteína é considerada um marcador inflamatório e um fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV) (FAEH; CHIOLERO; PACCAUD, 2006). Além disso, há forte evidência que esta molécula apresenta efeito neurotóxico direto (HO et al., 2002; ŠKOVIEROVÁ et al., 2016), estudos epidemiológicos indicam que altos níveis de homocisteína podem ser um fator de risco para condições neurodegenerativas, como EM e Alzheimer (SESHADRI, 2006; ZHU; HE; LIU, 2011).

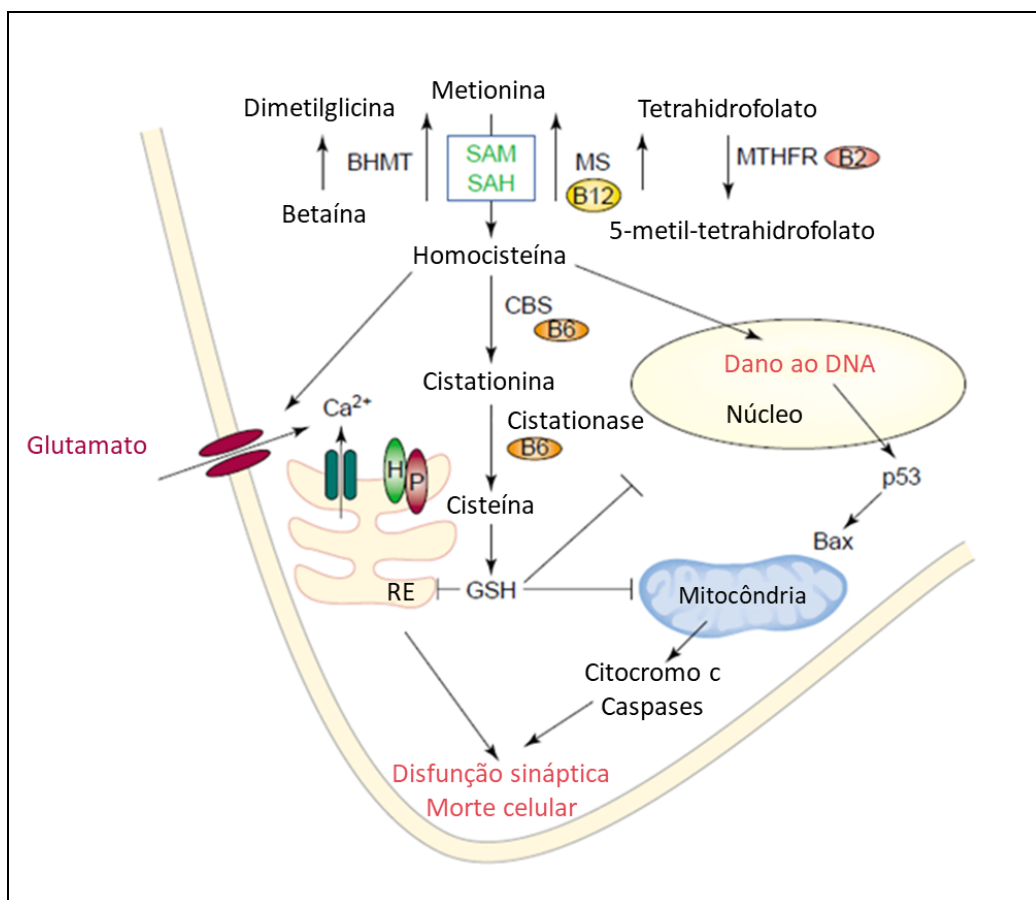
Em sua reação de síntese, a metionina proveniente da dieta proteica é ativa em S-adenosilmetionina (SAM), que perde um grupamento metil e forma a S-adenosilhomocisteína (SAH), seguida por hidrólise do S-adenosil e formação da homocisteína. Os níveis de homocisteína são controlados por dois mecanismos de regulação: (a) metilação, que é dependente da enzima metionina sintase, do metabolismo do ácido fólico e de vitamina B12; (b) transulfuração, onde a homocisteína se liga à serina dando origem a cistationina, que posteriormente dará origem ao antioxidante glutatona (MATTSON; SHEA, 2003).

Os níveis de homocisteína são normalmente mantidos baixos pela remetilação da homocisteína para regenerar a metionina, em uma reação que requer folato e vitamina B12. Além disso, a homocisteína convertida em cistationina pela ação da cistationina- $\beta$ -sintase (C $\beta$ S) pode aumentar os níveis de glutatona em um possível mecanismo compensatório que neutraliza o potencial dano oxidativo resultante do aumento da homocisteína (MATTSON; SHEA, 2003). O metabolismo da homocisteína e seu papel na sobrevivência e morte neuronal estão demonstrados na figura 6.

A homocisteína extracelular pode ser responsável por vários efeitos deletérios no SNC, uma vez que promove a excitotoxicidade via estimulação dos receptores de glutamato e danos ao DNA neuronal, desencadeando, assim, a apoptose (HO et al., 2002; ŠKOVIEROVÁ et al., 2016). O aumento na estimulação de ambos os receptores de glutamato, alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e N-metil-D-aspartato (NMDA), pode resultar no aumento da concentração de cálcio citoplasmático, aumentando a produção de radicais livres e ativação de caspases (ŠKOVIEROVÁ et al., 2016). Da mesma forma que as células neuronais, as células da glia também são expostas aos efeitos tóxicos

da homocisteína (LONGONI et al., 2018; ŠKOVIEROVÁ et al., 2015). Além disso, a homocisteína pode causar disfunção sináptica e morte neuronal promovendo danos no DNA e induzindo o estresse do retículo endoplasmático (MATTSON; SHEA, 2003). Estudos têm demonstrado que pacientes com EM apresentam maiores níveis de homocisteína quando comparado aos controles (MOGHADDASI et al., 2013; RAMSARANSING et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que valores maiores que 15  $\mu\text{mol/L}$  foram significativamente associados com prejuízo cognitivo, anormalidades visuais e progressão clínica em pacientes com EM (RUSSO et al., 2008). Outro estudo demonstrou que os níveis séricos de homocisteína foram associados com marcadores da progressão da EM mas não com o diagnóstico da doença, ou seja, não diferiram entre pacientes e controles (TEUNISSEN et al., 2008).

**Figura 6** O papel da homocisteína na sobrevivência e morte neuronal.



B2: vitamina B2; B6: vitamina B6; B12: vitamina B12; BHMT: metiltransferase de betaína-homocisteína; ER: retículo endoplasmático; GSH: glutationa; H: proteína de estresse do retículo endoplasmático induzível por homocisteína; MS: metionina sintase; MTHFR: 5,10-metilenotetrahydrofolato redutase; P: presenilina 1; SAH: S-adenosil-homocisteína; SAM: S-adenosilmetionina.  
Fonte: adaptado de Mattson; Shea (2003).

Outros estudos também encontraram associações entre os níveis elevados de homocisteína e prejuízo da incapacidade, estando presentes em pacientes com EDSS $\geq$ 5 (GUZEL et al., 2016) e associados com progressão da incapacidade (OLIVEIRA et al., 2018). Portanto, é concebível sugerir que a associação entre níveis mais elevados de homocisteinemia e aumento da incapacidade e progressão da doença pode ser explicada pelo efeito neurotóxico direto que a homocisteína provoca via mecanismo de excitotoxicidade, contribuindo assim para a neurodegeneração na EM (MATTSON; SHEA, 2003; ZHU; HE; LIU, 2011).

#### 1.1.5 Alterações Metabólicas na Esclerose Múltipla

O acúmulo de incapacidades em pacientes com EM é lento, mas persistente, muitas vezes levando a uma diminuição da mobilidade e atividade física, resultando em mais fraqueza, fadiga e aumento do risco de síndrome metabólica (SM). Por outro lado, a SM é considerada um dos fatores de risco para o desenvolvimento de EM em indivíduos suscetíveis (REALE; SANCHEZ-RAMON, 2017).

A SM é um desafio global de saúde pública e um transtorno complexo caracterizado por um conjunto de fatores interconectados que levam a um aumento do risco de DCV e diabetes mellitus tipo 2 (KASSI et al., 2011). A SM é geralmente definida como uma condição complexa representada por uma combinação de fatores de risco, como obesidade central, dislipidemia, hipertensão e alterações no metabolismo da glicose (REAVEN, 1997). Pesquisas anteriores mostraram que, para indivíduos com doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e EM, a proporção de SM é maior quando comparado aos indivíduos sem doenças autoimunes (PINHAS-HAMIEL et al., 2015; VERSINI et al., 2014).

Comorbidades metabólicas estão envolvidas no curso clínico da EM (MARRIE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2011). A resistência à insulina, hipertensão, hipercolesterolemia e doença vascular periférica foram independentemente associadas a um aumento do risco de incapacidade em pacientes com EM (MARRIE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014). A piora da incapacidade foi associada com níveis elevados de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL)-colesterol e triglicerídeos em pacientes com EM, enquanto que altos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL)-

colesterol foi associado com níveis mais baixos de atividade inflamatória aguda nestes pacientes (WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2011).

Os lipídeos estão envolvidos na regulação de funções neuronais, sinalização celular e na estrutura tecidual, sendo que as apolipoproteínas desempenham um papel chave em seu metabolismo e transporte (ADIBHATLA; HATCHER, 2007). Modificações oxidativas no colesterol LDL têm sido encontrada no parênquima de placas de EM (GILGUNSHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004). A peroxidação lipídica e a oxidação do LDL internalizado pela micróglia ativada e macrófagos nos estágios iniciais do desenvolvimento da lesão desempenham um papel crucial no processo de desmialinização (NEWCOMBE; LI; CUZNER, 1994). O colesterol HDL, por outro lado, apresenta efeitos protetores devido suas propriedades antioxidantes e seu papel no transporte reverso do colesterol (BALAZS et al., 2004).

Giubilei et al. (2002) encontraram uma forte associação entre colesterol total e LDL com o número de lesões gadolínio-positivo na RMN, indicando a presença de novas lesões (GIUBILEI et al. 2002). Um estudo prospectivo em pacientes com EM demonstrou que níveis elevados de colesterol total estavam associados a maior incapacidade avaliada por EDSS. Além disso, observou-se uma associação positiva entre a relação colesterol total/HDL e a variação anual do EDSS (TETTEY et al., 2014). Um estudo clínico realizado em pacientes com EM demonstrou que o uso de estatina estava associado a uma menor mudança no EDSS após dois anos de tratamento, quando comparado ao grupo placebo (CHATAWAY et al., 2013). Além disso, esses autores mostraram que, comparado ao placebo, a sinvastatina 80 mg por dia reduziu a taxa anual de atrofia cerebral total em 43%, considerado um efeito positivo, uma vez que estudos longitudinais mostraram uma relação entre a progressão da atrofia e a incapacidade. Esses autores também observaram um efeito pequeno, mas significativo, em dois dos desfechos de incapacidade secundária, avaliados pelo EDSS e pelo relato do paciente, apoiando um verdadeiro efeito da dislipidemia na progressão da doença (CHATAWAY et al., 2013).

## 1.2 TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

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 EMRR foi o interferon beta (IFN- $\beta$ ). Atualmente, numerosas formulações estão disponíveis para aplicação subcutânea e intramuscular, sendo que a mais recente é o IFN- $\beta$ a 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 autorreativas, 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, cefaleia, fadiga e calafrios que ocorrem em até 75% dos pacientes (TORKILDSEN; MYHR; BØ, 2016).

Outro composto utilizado é o acetato de glatirâmer, 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 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, tanto o IFN- $\beta$  e quanto o acetato de glatirâmer são aparentemente seguros e efetivos e deveriam ser selecionados como terapia de primeira linha (MARQUES et al, 2018). Os mecanismos de ação dos principais medicamentos utilizados no tratamento da EM estão descritos na figura 7.

Fingolimode foi a primeira terapia modificadora da doença oral aprovada para EMRR e atua como um modulador do receptor esfingosina 1 fosfato (S1P), impedindo a saída de leucócitos do linfonodo, com conseqüente redução na infiltração de linfócitos autorreativos no SNC (KAPPOS et al., 2010; COHEN et al., 2010). O principal efeito adverso do fingolimode está relacionado ao fato que os receptores esfingosina 1 fosfato 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).

Fumarato de dimetila é outra medicação oral aprovada para o tratamento de EMRR. Embora seu mecanismo de ação não seja completamente elucidado, sabe-se da sua atuação em diversos passos da reação imunológica, mediada principalmente por meio da ativação do fator nuclear tipo 2 (Nrf2) da via de transcrição, regulando os genes antioxidantes dependentes de Nrf2, sugerindo ação sobre o estresse oxidativo (LINKER et al., 2011; SCANNEVIN et al., 2012). Apresenta propriedades anti-inflamatórias, com inibição da resposta Th1 e Th17 e estimulação da resposta Th2 (OCKENFELS et al., 1998). 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 com conseqüente inibição da proliferação das células B e T autorreativas (CLAUSSEN; KORN, 2012). Os efeitos adversos mais comuns são cefaleia, 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 a redução duradoura na contagem de linfócitos e os efeitos adversos mais frequentes são infecções e linfopenia (FÖSTER et al., 2019).

O natalizumabe 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 natalizumabe é a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP). A LMP é uma doença desmielinizante causada pela infecção oportunista aos oligodendrócitos pelo poliomavírus John Cunningham (JC) (FÖSTER et al., 2019). Natalizumabe é altamente efetivo, 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).

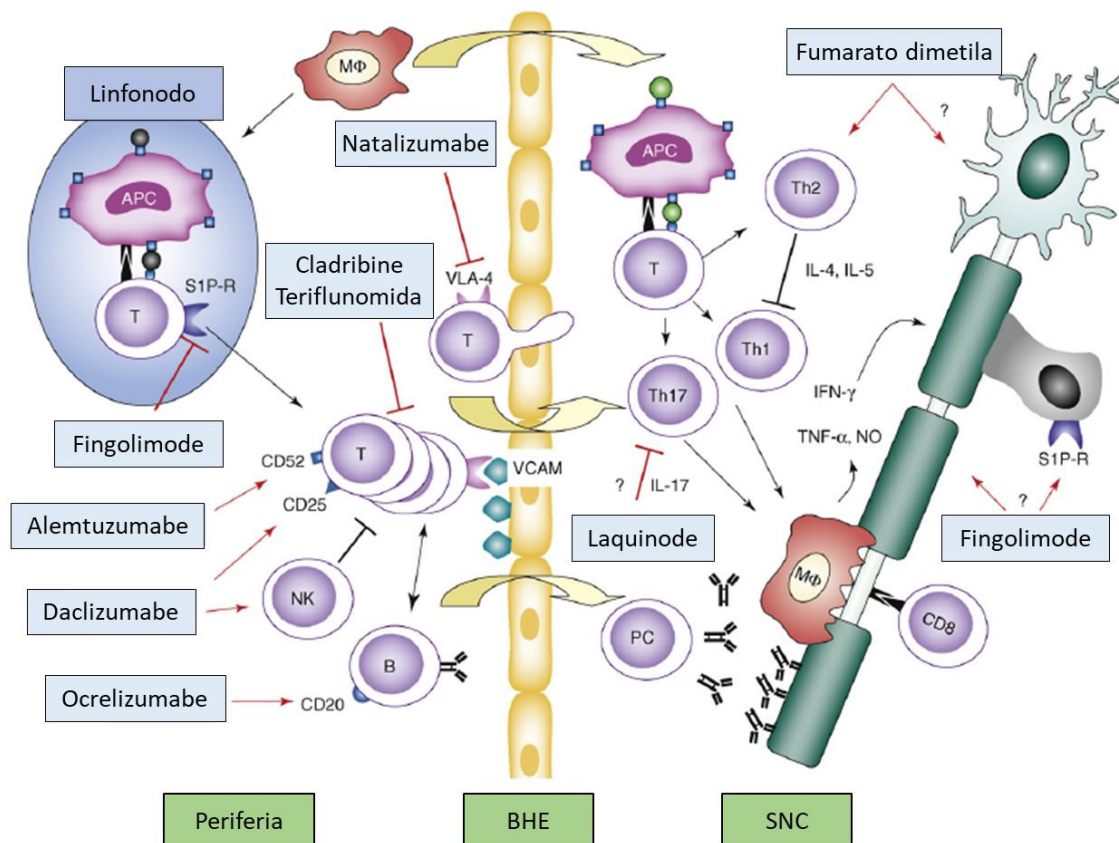
Com o sucesso do natalizumabe outros anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para EMRR, como o alemtuzumabe. Ele atua contra o CD52, um marcador presente na superfície de linfócitos, e outras células, levando à lise celular dependente de anticorpo e complemento, resultando em uma eliminação rápida e duradoura de linfócitos T e B CD52<sup>+</sup>, e conseqüentemente, diminuição da resposta autoimune (RUCK et al., 2015). O tratamento com alemtuzumabe é intravenoso e realizado em ciclos anuais (MARQUES et al., 2018). O efeito adverso mais importante consiste de doenças autoimunes secundárias (FÖSTER et al, 2019).

Ocrelizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga seletivamente a linfócitos B que expressam o antígeno de superfície CD20, levando à citotoxicidade direta destas células. 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).

Mitoxantrona é um agente antineoplásico que atua como um inibidor da topoisomerase tipo II utilizado no tratamento de câncer de mama metastático, leucemia mieloide aguda e linfoma não Hodgkin (FOX, 2004). Este medicamento é capaz de inibir a síntese de DNA e conseqüentemente a proliferação rápida de linfócitos T e B, sendo utilizado no tratamento da EMRR agressiva e da EMSP (MARQUES et al., 2018). Todavia seu uso tem diminuído devido às altas taxas de efeitos adversos incluindo cardiotoxicidade e leucemia (YAMOUT; ALROUGHANI, 2018; FÖSTER et al., 2019). A figura 8 demonstra o consenso brasileiro para o 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 ativos ou com fatores associados a um pior prognóstico, deveria se considerar o uso de drogas mais potentes como alemtuzumabe, cladribina, fingolimode, natalizumabe e ocrelizumabe (MARQUES et al., 2018). A figura 9 mostra a evolução no tratamento da EM.

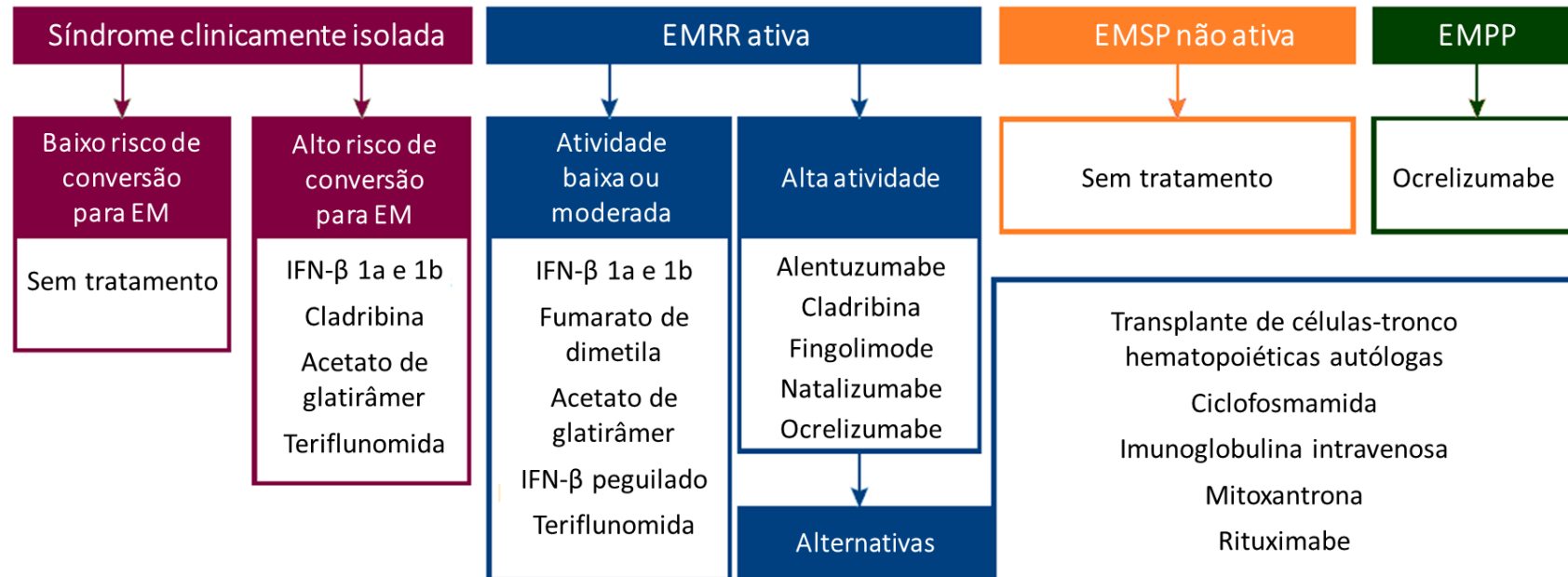
**Figura 7** Mecanismos de ação dos principais medicamentos utilizados no tratamento da esclerose múltipla



APC: célula apresentadora de antígeno; S1P-R: receptor esfingosina 1 fosfato; NK: natural *killer* T: linfócito T; B: linfócito B; Th: T *helper*; M $\phi$ : macrófago; PC: plasmócito; VCAM: molécula de adesão vascular celular; VLA-4: antígeno muito tardio-4; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferon gama; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa; NO: óxido nítrico; BHE: barreira hematoencefálica; SNC: sistema nervoso central.

Fonte: adaptado de Linker; Kieseier; Gold, 2008.

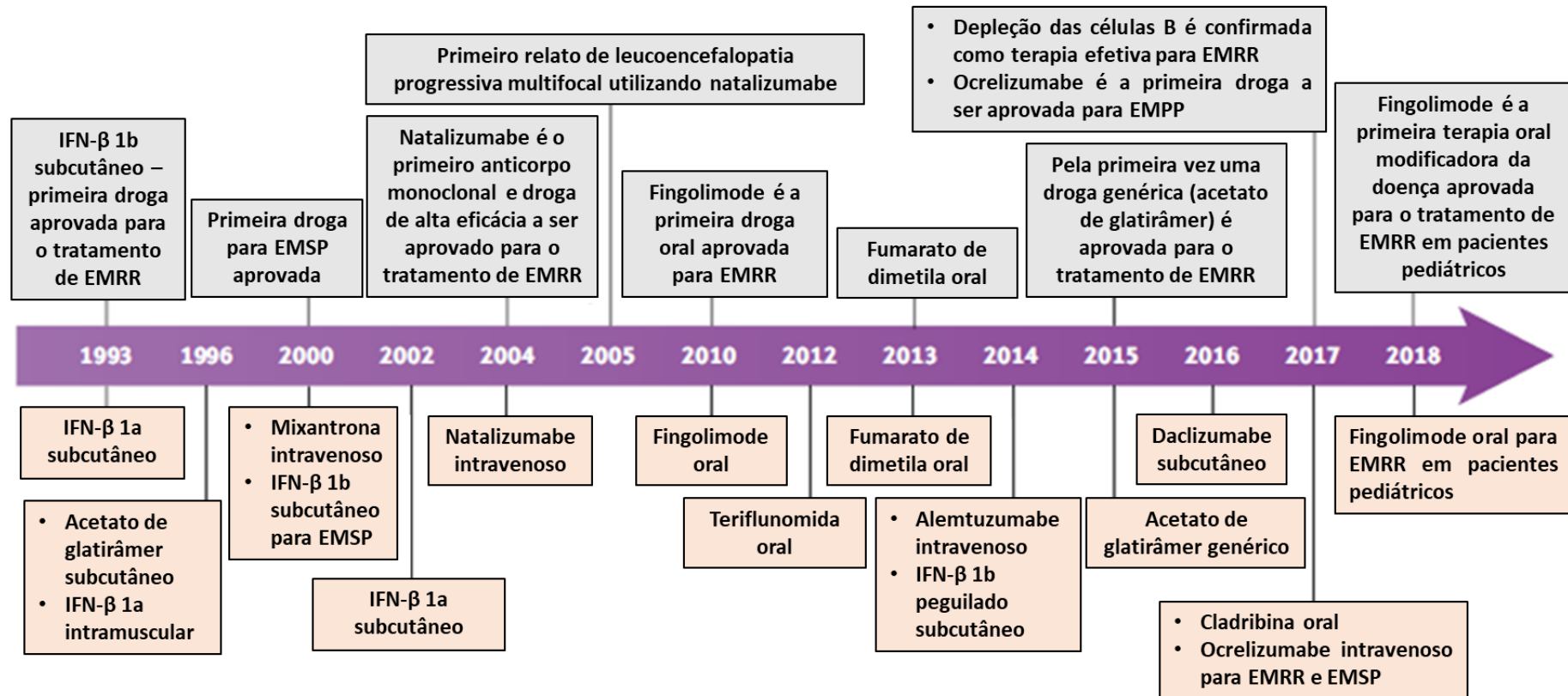
**Figura 8** Consenso brasileiro para o tratamento da esclerose múltipla



EM: esclerose múltipla; EMRR: esclerose múltipla remitente-recorrente; EMSP: esclerose múltipla secundariamente progressiva; EMPP: esclerose múltipla primariamente progressiva; IFN-β: interferon beta.

Fonte: adaptado de MARQUES et al., 2018.

**Figura 9** Linha do tempo do desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da esclerose múltipla



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 EMSP são mostradas nos quadros de cor rosa. IFNβ: interferon beta; EMRR: esclerose múltipla remitente-recorrente; EMSP: esclerose múltipla secundariamente progressiva; EMPP: esclerose múltipla primariamente progressiva.

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

## 2 JUSTIFICATIVA

Diante da fisiopatologia complexa e multifatorial da EM, o estudo de biomarcadores envolvidos em diferentes mecanismos da resposta inflamatória, metabólica e de estresse oxidativo pode contribuir para a compreensão da heterogeneidade clínica e de resposta ao tratamento apresentada pelos pacientes com EM. Portanto, um estudo concomitante destes diferentes biomarcadores da resposta imuno-inflamatória, metabólica, de estresse oxidativo e nitrosativo (IM&NO) pode possibilitar a identificação de um modelo preditor para a avaliação da incapacidade destes pacientes. Os resultados podem, também, apontar dados para possíveis estratégias terapêuticas que possam ser utilizadas em associação com os atuais medicamentos no tratamento de pacientes com EM, em especial aos que não respondem a estes medicamentos, contribuindo para um melhor prognóstico destes pacientes.

Além disto, os escassos estudos sobre a variante rs3761548 -3297 C>A no gene *FOXP3* em pacientes com EM tiveram como objetivo avaliar sua associação com a suscetibilidade à doença; ainda, foram realizados em populações do Hemisfério Norte (Irã e Polônia), geneticamente mais homogêneas que a população brasileira, o que limita a sua generalização. Além de terem apresentado resultados conflitantes, não se avaliou o papel desta variante na incapacidade, progressão da incapacidade bem como nas citocinas imunomoduladoras, como IL-10 e TGF- $\beta$ , envolvidas na fisiopatologia da EM

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar os marcadores imunológicos, metabólicos e de estresse oxidativo e a variante rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes com EM.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a associação entre as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas, clínicas e biomarcadores da resposta imuno-inflamatória, metabólica, de estresse oxidativo e nitrosativo (IM&NO) e a incapacidade dos pacientes com EM;
- Propor um modelo de biomarcadores IM&NO que possam prever a incapacidade e a progressão da incapacidade nos pacientes com EM;
- Avaliar a frequência da variante rs3761548 no gene *FOXP3* nos pacientes com EM e grupo controle;
- Determinar a associação entre as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas, clínicas, citocinas e a incapacidade nos pacientes com EM de acordo a variante rs3761548 no gene *FOXP3*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade de Londrina (UEL), com o Parecer de Aprovação no. 250/2013, CAAE nº. 22290913 9 0000 5231, em 17 de março de 2014 (Anexo A). Todos os participantes 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 (Apêndice A).

### 4.2 Delineamento

Para a avaliação dos biomarcadores IM&NO que estavam associados com a incapacidade, realizou-se um estudo descritivo e transversal, e para a avaliação da variante rs3761548 no gene *FOXP3*, foi realizado um estudo de caso-controle.

### 4.3 POPULAÇÃO

Foram convidados a participar do estudo todos os pacientes com diagnóstico de EM, adultos e de ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da UEL, em Londrina, Paraná. O convite foi realizado de forma consecutiva durante o ano de 2015. Neste mesmo período, foram convidados indivíduos adultos, de ambos os sexos, sem histórico de doenças autoimunes, entre os candidatos a doadores de sangue do Hemocentro Regional de Londrina, em Londrina, Paraná, para constituírem o grupo controle.

### 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram seguidos os seguintes critérios de exclusão: pacientes que se recusaram a participar do estudo; presença de processo infeccioso; os pacientes com a forma CIS e neuromielite óptica, pacientes e controles que estavam em uso de medicamentos anti-inflamatórios, suplemento com vitamina D e/ou antioxidante.

#### 4.5 AMOSTRA

A amostra foi obtida por conveniência de tempo e local. Foram avaliados no estudo 170 pacientes com EM, diagnosticados segundo os critérios de McDonald (POLMAN et al., 2011) e classificados como EMRR, EMSP e EMPP. O grau de incapacidade dos pacientes foi avaliado por meio da EDSS, no momento da admissão (*baseline*), com escores que variam de 0,0 a 10,0 (KURTZKE, 1983). Os pacientes foram categorizados com incapacidade leve (EDSS < 3,0) e moderada /grave (EDSS ≥ 3,0), como descrito previamente (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 ≥ 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).

O grupo controle foi composto de 182 indivíduos selecionados entre candidatos a doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina. Além dos critérios de exclusão definidos para os pacientes, os indivíduos do grupo controle apresentaram ausência de reatividade em todos os testes sorológicos realizados na triagem de doadores de sangue, como anticorpos contra o vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2, anticorpos contra o vírus da hepatite C, antígeno de superfície do vírus da hepatite B, anticorpos contra o antígeno *core* do HBV, anticorpos contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipos I e II, anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* e teste não treponêmico para sífilis.

Foram coletados dados demográficos (idade, sexo, etnia), epidemiológicos, antropométricos [peso, altura e índice de massa corpórea (IMC)], estilo de vida e história médica foram obtidas na avaliação clínica, por meio de um questionário (Apêndice B). Foram, também, obtidos dados clínicos como pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), formas clínicas, EDSS, terapia para EM dos indivíduos inseridos no estudo. 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.

O peso corporal foi medido com aproximação de 0,1 quilograma (kg) utilizando uma balança eletrônica, com os indivíduos vestindo roupas leves, sem sapatos e no período da manhã. A altura foi medida com uma aproximação de 0,1 centímetro (cm) por meio de um estadiômetro. O IMC foi calculado como peso (kg) dividido pela altura (m) ao quadrado.

PAD e PAS foram obtidas no período da admissão pelo uso de aparelho digital devidamente calibrado e expressas em mmHg. PAS  $\geq$ 130 mmHg e PAD  $\geq$ 90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo foram os critérios considerados para definir hipertensão (JAMES et al., 2014). Presença de DM foi definida como glicose em jejum  $\geq$ 126 mg/dL e/ou o uso de medicamentos hipoglicemiantes (*American Diabetes Association*, 2014).

A SM foi definida quando o indivíduo apresentou três ou mais das seguintes medidas: obesidade abdominal com circunferência abdominal  $\geq$ 90 cm para homens, e  $\geq$ 80 cm para mulheres; níveis de triglicerídeos  $\geq$ 150 mg/dL; colesterol HDL menor que 40 mg/dL para homens e menor que 50 mg/dL para mulheres; glicose em jejum  $\geq$ 100 mg/dL ou uso de hipoglicemiantes; e/ou PAS  $\geq$ 130 mmHg e PAD  $\geq$ 85 mmHg ou uso de anti-hipertensivos, de acordo com os critérios propostos pela “*American Heart Association*” (GRUNDY et al., 2005).

#### 4.6 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após jejum de 12 horas, os indivíduos (pacientes e controles) foram submetidos à coleta de sangue venoso sem e com anticoagulante (10 mL e 20 mL, respectivamente). O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas do soro, plasma e *buffy-coat* foram armazenadas no *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia.

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS, IMUNOLÓGICOS E METABÓLICOS

Os níveis de ácido úrico, glicose, colesterol total, colesterol HDL, LDL e triglicerídeos foram determinados por método colorimétrico em autoanalisador bioquímico (*Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA*), utilizando kits Dade Behring®. Os níveis de insulina e homocisteína foram avaliados por imunoensaio em micropartícula com quimiluminescência (*Architech™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA*). Os níveis de IL-6, IL-17A, IL-10 e TGF- $\beta$ 1 foram determinados por ensaio magnético de microesferas em multiplex pelo kit (*Novex Life Technologies, Frederick, MD, USA*) para plataforma Luminex® utilizando o equipamento MAGPIX® (*Luminex Corporation, Austin, TX, USA*).

#### 4.8 MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO

##### 4.8.1 Peroxidação lipídica

A avaliação da formação de hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita anteriormente (GONZALEZ FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991) utilizando o equipamento GloMax® 20/20 *Luminometer* (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os resultados foram expressos em contagens por minuto (cpm).

##### 4.8.2 Produtos avançados da oxidação proteica (AOPP)

Os níveis de AOPP foram determinados no plasma pelo método descrito previamente por Witko-Sarsat et al (1998). AOPP resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos, tais como a tirosina, que conduzem à formação de produtos ditirosina detectados por espectrofotometria em ensaio colorimétrico (*Microplate reader* LMR-96, *Loccus*, Cotia, São Paulo, Brasil). As concentrações de AOPP foram expressas em  $\mu\text{mol/L}$  de equivalentes de cloramina-T.

##### 4.8.3 Determinação de proteínas carbonílicas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). As proteínas carbonílicas plasmáticas foram avaliadas por espectrofotometria utilizando a leitora de microplacas (*Microplate reader* LMR-96, *Loccus*, Cotia, São Paulo, Brasil), em uma adaptação da técnica descrita por Reznick e Packer (1994). O método baseia-se na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4dinitrofenilhidrazona que é determinada em ensaio colorimétrico. Os resultados foram expressos em nmol de proteínas carbonílicas/mg proteínas totais.

##### 4.8.4 Metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Os níveis de NOx foram determinados no plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess, como descrita previamente (NAVARRO-GONZÁLVIZ;

GARCÍA-BENAYAS; ARENAS, 1998). Esta técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ .

#### 4.9 VARIANTE RS3761548 DO GENE *FOXP3*

##### 4.9.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico a partir do *buffy-coat* de ambos os grupos foi realizada utilizando o método de separação em coluna com reagentes comercialmente disponíveis (*Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil*), segundo as instruções do fabricante.

A integridade do DNA extraído foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando-se 5  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA extraído e 5  $\mu\text{L}$  do corante xileno cianol (XC). A eletroforese foi realizada a 100 V, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Após a corrida de 45-60 minutos, o gel foi submerso em uma cuba com tampão TAE 1x (*Gibco™, Invitrogen Corporation, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) contendo brometo de etídio (20 mg/mL) por 20 minutos e a imagem do gel foi capturada e armazenada pelo sistema de fotodocumentação L-PIX-HE (*Locus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil*). Em cada eletroforese realizada, foi incluído um controle de DNA, com concentração de 100 ng/ $\mu\text{L}$ , para análise comparativa com o DNA das amostras do estudo.

##### 4.9.2 Reação em Cadeia da Polimerase para a variante alélica do *FOXP3* rs3761548

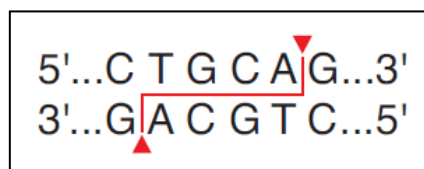
Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar um fragmento de 155 pares de base (pb) do gene *FOXP3* utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguindo os protocolos descritos na literatura, com algumas modificações (BANIN HIRATA et al., 2017). Os *primers* utilizados para a amplificação de uma sequência de 155 pb do gene *FOXP3* foram sintetizados de acordo com a sequência do *GenBank* número NT\_079573. O *primer forward* é formado pela sequência 5' GGC AGA GTT GAA ATC CAA GC 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' CAA CGT GTG AGA AGG CAG AA 3'.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 0,25mM de cada *primer*, 1,50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,10mM de dNTP (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em seu tampão 1X (20mM de Tris-HCl pH: 8,5; 50mM de KCl) (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e 100ng da amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA*), com um ciclo de desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 30 segundos a 65°C para o anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos.

Para a análise da amplificação do gene *FOXP3*, 5 µL do produto por PCR e 5 µL do corante XC foram aplicados em gel de poliacrilamida 10%. Em cada eletroforese foi incluído o controle negativo, com ausência de DNA e o *ladder* de 50pb (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) para determinar o tamanho do fragmento de DNA amplificado. A eletroforese foi realizada a 100 V por 60 minutos com posterior coloração do gel com nitrato de prata.

#### 4.9.3 Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) para a variante rs3761548

A enzima de restrição *PstI* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) é purificada de *Providencia stuartii* e tem como sítio de restrição a sequência de nucleotídeos mostrada abaixo.

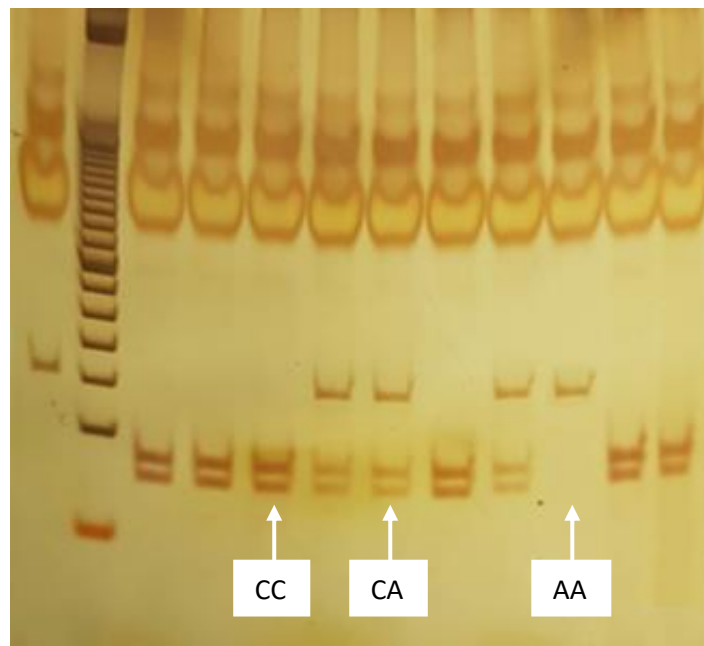


A partir dos produtos de amplificação da PCR, foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *PstI*. Cinco microlitros do produto da PCR foram completamente digeridos com 0,3 µL de enzima *PstI* 10U/µL *overnight* a 37°C em termobloco. Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%,

aplicando-se 5  $\mu$ L do produto de digestão enzimática de cada amostra e 5  $\mu$ L de corante XC no gel para a visualização dos fragmentos formados. A eletroforese foi realizada a 100 V durante 60 minutos e o gel corado com nitrato de prata conforme descrito anteriormente (BANIN HIRATA et al., 2017). A análise dos fragmentos permitiu a identificação dos três genótipos da variante em estudo (figura 11).

- CC representa o genótipo com homozigose para o sítio de restrição e apresenta dois fragmentos na eletroforese, com 75 pb e 80 pb.
- CA representa o genótipo em heterozigose, contendo três fragmentos na eletroforese, com 75 pb e 80 pb (provenientes da clivagem do sítio de restrição presente no alelo C) e 155 pb (proveniente do alelo A que não sofre a ação da enzima).
- AA representa o genótipo em homozigose sem o sítio de restrição, apresentando somente um fragmento com 155 pb.

**Figura 10** Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata para leitura dos genótipos do rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A



Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata caracterizando os três genótipos após a digestão com a enzima de restrição *Pst*I. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de um único fragmento com 155 pb); genótipo CC (presença de dois fragmentos com 80 e 75 pb); genótipo CA (presença de três fragmentos com 155, 80 e 75pb).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de contingência (teste  $\chi^2$ ) foram utilizadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e grupos de diagnóstico, sendo expressas em número absoluto (n) e o percentual (%). Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas entre os grupos utilizando análises de variância (ANOVA) e teste de Mann-Whitney quando não houve normalidade em ambos os grupos, sendo expressas como média  $\pm$  desvio padrão (*Standard deviation*, SD) ou mediana e intervalo interquartil (25-75%), quando apropriado.

Para o artigo 1, os valores de EDSS foram categorizados em dois grupos, utilizando o valor de corte  $\geq 3$ . Correlações entre variáveis contínuas foram calculadas com os coeficientes de correlação de Pearson. A análise univariada do modelo linear geral (GLM) foi utilizada para avaliar os efeitos das variáveis independentes (incluindo os biomarcadores imuno-inflamatórios, metabólicos e de estresse oxidativo, SM, tratamento) nas variáveis dependentes (escore EDSS), ajustando-se para idade, IMC e sexo. A análise de regressão logística binária *stepwise* foi utilizada para avaliar os biomarcadores mais significativos que predizem o grupo com EDSS  $\geq 3$  (com EDSS  $< 3$  como grupo de referência).

Usamos os valores de Nagelkerke como estimativas do tamanho do efeito e cálculo da *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC95%). Uma análise de em camadas de redes neurais (*Multilayer Perceptron Neural Network models*) foi utilizada para identificar os melhores biomarcadores associados com a incapacidade moderada/grave (EDSS  $\geq 3$ ) e para avaliar as complexas relações não-lineares entre escores EDSS e biomarcadores e outras variáveis, como SM e idade. Utilizamos modelos automatizados de arquitetura *feedforward* com biomarcadores SM, idade, sexo, duração da doença como variáveis de entrada, enquanto a camada de saída contém os subgrupos EDSS (dicotomizados) ou os escores do teste EDSS (variáveis de escala) como variáveis de saída. Calculamos a área sob a curva operacional de recepção (AUC ROC) ou a correlação entre o escore EDSS previsto pelo modelo e o escore EDSS real foram computados. Finalmente, avaliamos a importância (relativa) das variáveis de entrada nas análises de sensibilidade e especificidade.

Para o artigo 2, o teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição. A transformação da raiz quadrada foi utilizada em IL-10 e TGF- $\beta$

para garantir a normalidade dos dados, pois as variáveis não apresentaram distribuição normal e heterogeneidade de variância (avaliada pelo teste de Levene). As correlações entre TGF- $\beta$  e IL-10 foram avaliadas pelos coeficientes de correlação de Spearman. A associação entre a variante genética *FOXP3* foi analisada em modelos dominantes, co-dominantes e recessivos de acordo com o sexo. A análise multivariada do modelo linear geral (GLM) foi usada para avaliar os efeitos das variáveis explicativas (incluindo o diagnóstico) nas variáveis dependentes (TGF- $\beta$  e IL-10) enquanto controlava a idade, sexo, etnia, IMC e tabagismo. A associação entre os níveis de TGF- $\beta$  e EDSS > 3 e a variante *FOXP3* de acordo com o sexo foi avaliada por meio de análise de regressão logística binária automática *stepwise* controlada por covariáveis que podem confundir a associação de interesse em três modelos diferentes. A análise também incluiu o odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC) avaliados.

A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 22.0 (SPSS 31 Inc., CHIGADO, IL, EUA) e a significância estatística foi definida como  $p < 0,05$ . Todos os dados foram analisados utilizando as janelas do IBM SPSS versão 24, Statistica 12, MaesStat e MATLAB.

## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos:

- Artigo 1: *Disability in multiple sclerosis associated with age and inflammatory, metabolic and oxidative/nitrosative stress biomarkers: results of multivariate and machine learning procedures.* O artigo foi submetido na revista *Metabolic Brain Disease*, Fator de impacto: 2,441.
- Artigo 2: *The rs3761548 FOXP3 variant is associated with multiple sclerosis and transforming growth factor  $\beta$ 1 levels in female patients.* O artigo foi submetido na revista *Molecular Neurobiology*, Fator de impacto: 5,076.

## 5.1 ARTIGO 1

**Disability in multiple sclerosis is associated with age and inflammatory, metabolic and oxidative/nitrosative stress biomarkers: results of multivariate and machine learning procedures**

Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>2</sup>, Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira<sup>1</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Sayonara Rangel Oliveira<sup>2</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>2</sup>, Damacio Ramón Kaimen-Maciel<sup>3</sup>, Michael Maes<sup>4,5</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program, 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>Department of Clinical Medicine- University of Londrina, Londrina, Paraná, 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, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil; E-mail: reiche@sercomtel.com.br, Tel/Fax: +55 43 3371 2619.

ORCID: 0000-0001-6507-2839

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the immune-inflammatory, metabolic, and nitro-oxidative stress (IM&NO) biomarkers as predictors of disability in multiple sclerosis (MS) patients. A total of 122 patients with MS were included; their disability was evaluated using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and IM&NO biomarkers were evaluated in peripheral blood samples. Patients with EDSS  $\geq 3$  were older and showed higher homocysteine, uric acid, advanced oxidized protein products (AOPP) and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol and higher rate of metabolic syndrome (MetS), while high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was lower than in patients with EDSS  $< 3$ ; 84.6% of all patients were correctly classified in these EDSS subgroups. We found that 36.3% of the variance in EDSS score was explained by age, Th17/T regulatory (Treg) and LDL/HDL ratios and homocysteine (all positively related) and body mass index (BMI) (inversely related). After adjusting for MS treatment modalities, the effects of the LDL/HDL and zTh17/Treg ratios, homocysteine and age on disability remained, whilst BMI was no longer significant. Moreover, carbonyl proteins were associated with increased disability. In conclusion, the results showed that an inflammatory Th17 profile coupled with age and increased carbonyl proteins were the most important variables associated with high disability followed at a distance by homocysteine, MetS and LDL/HDL ratio. These data underscore that IM&NO pathways play a key role in increased disability in MS patient and may be possible new targets for the treatment of these patients. Moreover, a panel of these laboratory biomarkers may be used to predict the disability in MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis; disability; inflammation; oxidative stress; homocysteine; biomarkers

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory immune-mediated disease that affects the central nervous system (CNS) and is the major cause of disability in adults. Many different pathological mechanisms are involved in MS, including autoimmune inflammation, demyelination, neurodegeneration with axonal and death and gliosis in the brain and spinal cord. Genetic, immunological, hormonal, environmental, and epigenetic factors are most likely responsible for the heterogeneity of neurological symptoms disseminated in time and space, as well as disease progression (Versini et al., 2014). The autoimmune inflammation in early MS is primarily mediated by adaptive immune responses and involves autoreactive T cells, B cells, and antibodies, while the later, chronic stages of MS are characterized by a compartmentalized immune response in the CNS with activated microglia and macrophages (Sospedra; Martin 2016). The adaptive immune response in MS is characterized by the imbalance in the expression of T helper (Th)1, Th2, Th17 and T regulatory (Treg) cytokines, as well as chemokines and their receptors (Mikulkova et al., 2011; Sospedra and Martin, 2005; Sospedra and Martin, 2016).

Mounting evidence suggests that autoreactive Th1 and Th17 cells generated in the periphery have the ability to enter to the CNS by crossing the brain blood barrier (BBB). There, they persist and generate an inflammatory cascade and increase reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) leading to formation of lesions and neurologic deficits (Das Sarma et al. 2009; Murphy et al. 2010). Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels are associated with changes in MS disease activity (Graber et al. 2007). Interleukin (IL)-17A produced by a number of different cell types plays a critical role in the pathogenesis of MS by affecting the BBB breakdown, inducing the infiltration of immune cells into the CNS compartment, amplifying inflammatory responses and by the generation of cytotoxic mediators that result in demyelination and neuronal damage

(Kolbinger et al. 2016). Moreover, there is ample evidence that Treg cells, which are characterized by secretion of IL-10 and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ , are important for controlling inflammatory mechanisms in animal models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In MS, a reduced number and activity of Treg were described (Haas et al. 2005).

Moreover, oxidative and nitrosative stress play a major role in the development and progression of chronic and autoimmune diseases, including MS (Dichi et al., 2014). The increased production of ROS and RNS leads to high production of oxidized substrates, such as lipids, proteins and nucleic acid, that contribute to immune dysregulation and aggravate the clinical course of the MS (Sayre et al. 2008). Excessive nitro-oxidative stress and decreased anti-oxidant levels are found in MS patients and are associated with disability progression (Oliveira et al. 2012).

Changes in metabolic pathways and metabolic comorbidities are involved in the disease course of MS and disability (Marrie et al. 2010; Weinstock-Guttman et al. 2011; Oliveira et al. 2014). There is strong evidence that homocysteine, an inflammatory marker of risk for cardiovascular disease (Faeh et al. 2006) is able to induce BBB disruption (Kamath et al. 2006). Studies in animal models demonstrated that homocysteine is neurotoxic and increased risk of neurodegenerative diseases (Bonetti et al. 2016; Longoni et al. 2018). Increased levels of homocysteine were associated with cognitive impairment in neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease and MS (Seshadri 2006; Russo et al. 2008), and were associated with MS clinical progression (Teunissen et al. 2008; Oliveira et al. 2018).

Disability accumulation over time in MS patients is slow but persistent, often leading to a decreased mobility and physical activity, resulting in more weakness, fatigue and increased risk of metabolic syndrome (MetS). On the other hand, MetS may trigger MS in

susceptible individuals and is considered one of the risk factors (Reale and Sanchez-Ramon 2017). Insulin resistance, hypertension, hypercholesterolemia, and peripheral vascular disease were independently associated with increased risk of disability (Marrie et al. 2010; Oliveira et al. 2014). Worsening disability was associated with high total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, and triglycerides in patients with MS, whilst high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol was associated with low levels of acute inflammatory activity (Weinstock-Guttman et al. 2011).

MS is a heterogeneous disease and the search for more adequate biomarkers predicting disease course is currently an active area of research. The concomitant evaluation of immune-inflammatory (Th1, Th17 and Treg response), metabolic pathways (MetS, lipid metabolism, homocysteine) and oxidative stress biomarkers may provide more accurate predictive models for the evaluation of disease disability in MS patients. Hence, the aim of the present study was to evaluate immune-inflammatory, metabolic and nitro-oxidative stress (IM&NO) biomarkers as predictors of disability in MS patients.

## **Materials and Methods**

### *Subject Data*

The study included 122 MS patients consecutively recruited from the Demyelinating Diseases Outpatient of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, South of Brazil. The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria (Polman et al. 2011), and the patients were classified with relapsing-remitting MS (RRMS) (n=103) or progressive MS (n=19), including primary progressive MS (PPMS, n=3) and secondary progressive MS (SPMS, n=16). The majority of the patients were treated with interferon (IFN)- $\beta$  (n=76), and others with glatiramer acetate (n=30), natalizumab (n=7), and fingolimod (n=2). Patients without treatment (n=7) were those who abandoned therapy or were drug naïve at the time of

blood collection. Disability was evaluated using the EDSS score (Kurtzke 1983) and the patients were categorized with mild (EDSS <3) and moderate/severe (EDSS  $\geq$ 3) disability (Kallaur et al. 2017). All MS patients were in the remission clinical phase, defined as the period of recovery with no relapse episodes within the last three months prior to the time of enrollment in the study. The patients were not on a special diet or on the use of antioxidants.

Baseline characteristics and the MS therapy used before the enrollment of MS patients were obtained using a standard questionnaire on study admission. The ethnicity was self-reported as Caucasians and non-Caucasians (Black, Afro-Brazilian, and Asiatic) (IBGE: Brazilian Institute of Geography and Statistics 2011; Suarez-Kurtz et al. 2012). Body mass index (BMI), waist circumference, systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) values were measured as previously described (Kallaur et al., 2017; Oliveira et al., 2016). Type 2 diabetes mellitus (T2DM) 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 (American Diabetes Association 2014). MetS was defined as previously reported (Grundy et al. 2005).

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.

#### *Blood Collection, Biochemical and Immunological Biomarkers*

Venous blood samples were obtained after fasting for 12 h with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant and without anticoagulant. The samples were consecutively and anonymously coded and centrifuged at 2,500 rpm for 15 min. Further, plasma and serum aliquots were stored at  $-80^{\circ}$  C until use. Uric acid, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides, and glucose were evaluated using enzymatic colorimetric assay with a biochemical autoanalyzer (Dimension® EXL200, Siemens

Healthcare Diagnostics Ltd, Newark, DE, USA). Homocysteine levels were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA, Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). IL-6, IL-17 and IL-10 levels were determined using microspheres multiplex immunoassay (Novex Life Technologies, Frederick, MD, USA) for Luminex platform (MAGPIX®, Luminex Corp., Austin, TX, USA). All laboratory analysis were performed according to the manufacturer's instructions and their reference values.

#### *Oxidative and nitrosative stress biomarkers*

The oxidative and nitrosative stress biomarkers were determined as reported elsewhere (Oliveira et al., 2012; Oliveira et al., 2016). Briefly, lipid hydroperoxides were evaluated by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH), as described (Gonzales-Flecha et al., 1991), using the GloMax® 20/20 Luminometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Advanced oxidation protein products (AOPP) and protein carbonyl levels were determined as described previously (Witko-Sarsat et al., 1998; Reznick; Packer, 1994, respectively) using colorimetric assay (Microplate reader LMR-96, Loccus, Cotia, São Paulo, Brazil). Nitric oxide (NO) was estimated by measuring NO metabolites (NO<sub>x</sub>) nitrites (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitrates (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) using colorimetric assay, according to Navarro-González et al., (1998) and the results were obtained by microplate reader (LMR-96, Loccus, Cotia, São Paulo, Brazil).

#### *Statistical Analysis*

Continuous variables were expressed as mean and  $\pm$  standard deviation ( $\pm$  SD) and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). Analysis of variance (ANOVAs) was employed to check differences in continuous variables among EDSS groups dichotomized using a cut off value  $\geq 3$ . Analysis of contingency tables ( $\chi^2$  tests) was used to assess the associations between these EDSS groups and other nominal variables.

Correlations between scale variables were computed with Pearson's product moment correlation coefficients. Computed z unit-weighted composite scores were used to assess indices of atherogenicity based on HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels, and indices of Th17 profile using the cytokine levels, as reported previously (Maes and Carvalho 2018).

Univariate general linear model (GLM) analysis was employed to assess the effects of independent variables (including biomarkers, MetS, drug state) on the dependent variables (the EDSS score), while adjusting for age, BMI and sex. Hierarchical binary logistic regression analysis was used to delineate the most significant explanatory variables predicting the group with EDSS scores  $\geq 3$  (with EDSS  $< 3$  as reference group). We used Nagelkerke values as estimates of effect size and computed Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). A multilayer perceptron (MLP) neural network (NN) analyses was used to separate patients with EDSS scores  $\geq 3$  from those with scores  $< 3$  and to assess the complex non-linear relationships between EDSS scores and biomarkers and other variables, such as MetS and age. We used automated feedforward architecture models with biomarkers MetS, age, sex, duration of illness as input variables, while the output layer contains the EDSS subgroups (dichotomized) or EDSS test scores (scale variables) as output variables. Two hidden layers were considered with a variable number of nodes. As a stopping rule, we used one consecutive step with no further decrease in the error term. The relative number of cases assigned to the training (to estimate the network parameters), testing (to prevent overtraining) and holdout (to evaluate the final network) sets were 7, 3 and 3, respectively. We computed error terms for the training and testing samples as well as relative errors in the three samples. The rate of incorrect predictions and the partitioned confusion matrices for categorical output variables (EDSS groups) in the three samples and the area under the receiving operating curves (AUC ROC) or the correlation between the model-predicted EDSS score and the actual EDSS score were computed. Finally, we assessed the (relative) importance of the input

variables in sensitivity analyses. The EDSS score was used both as a continuous and also as a binary-split dichotomized dependent variable in regression and NN analyses. The former method because the use of continuous dependent variables is statistically more adequate than using its dichotomized values (Altman and Royston 2006; Naggara et al. 2011). The second method was employed because an EDSS score  $\geq 3$  is a recognized cut-off point denoting increased disability and, thus, is important in the clinical practice. All data were analyzed using IBM SPSS windows version 25 and Statistica 12.

## Results

### *Subjects characteristics*

Table 1 shows the demographic, clinical as well as the biomarker characteristics of subjects according to the EDSS score  $\geq 3$  *versus* those with EDSS score  $< 3$ . We did not use p-corrections for false discovery rate because the results of Table 1 and the correlation matrices between the variables shown in Table 1 were used to delineate the explanatory variables that were consequently used in the multivariate statistical analyses presented in Tables 3 and 4. Three patients did not have data on EDSS score. Patients with higher EDSS score were significantly older than those with lower EDSS score. There were no significant differences in sex ratio (female/male), ethnicity, smoking and alcohol use, T2DM frequency, BMI, waist circumference, cytokines, NO<sub>x</sub>, CL-LOOH, and carbonyl proteins between both groups. Nevertheless, subjects with EDSS  $\geq 3$  showed higher homocysteine, uric acid, AOPP and LDL-cholesterol levels and higher rate of MetS, while HDL-cholesterol levels were significantly lower than those with EDSS  $< 3$ .

There were significant positive correlations between age and AOPP ( $r=0.234$ ,  $p=0.010$ ), NO<sub>x</sub> ( $r=0.234$ ,  $p=0.010$ ), carbonyl proteins ( $r=0.188$ ,  $p=0.039$ ), homocysteine ( $r=0.224$ ,  $p=0.015$  and LDL-cholesterol ( $r=0.333$ ,  $p<0.001$ ), but not with the other

biomarkers. There were significant sex-related differences in uric acid and homocysteine, but not with the other biomarkers. Uric acid (mean  $\pm$ SD =  $4.7 \pm 1.1$  versus  $3.8 \pm 1.2$  mg/dL;  $F=14.91$ ,  $df=1/120$ ,  $p<0.001$ ) and homocysteine ( $13.9 \pm 4.6$  versus  $11.7 \pm 3.7$   $\mu$ mol/L;  $F=8.26$ ,  $df=1/117$ ,  $p=0.005$ ) were significantly higher in males than females. HDL-cholesterol was significantly lower in men than women ( $45.3 \pm 13.2$  versus  $57.6 \pm 18.7$  mg/dL;  $F=13.61$ ,  $df=1/116$ ,  $p<0.001$ ). Duration of illness was significantly associated with EDSS score ( $r=0.368$ ,  $p<0.001$ ,  $n=119$ ) and NOx ( $r=0.317$ ,  $p<0.001$ ,  $n=121$ ), but not with the other biomarkers.

#### *Use of z unit-weighted composite scores*

Consequently, we have computed z unit-weighted composite scores to assess indices of atherogenicity based on HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels, reflecting Castelli index risk factor 1 as z value of total cholesterol (z cholesterol) - zHDL-cholesterol (zcholesterol/HDL). We also computed zLDL-zHDL as an atherogenic marker reflecting Castelli risk index 2. Table 2 shows that both Castelli risk indices were strongly correlated with the new z unit-weighted composite scores. Likewise we computed z unit-weighted composite scores reflecting Th17 profile activity as z natural logarithmic of IL-6 (zLnIL-6) + zLnIL-17 (zTh17). Table 2 shows that this z composite score is similar to the first principal component (PC) extracted from both LnIL-6 and LnIL-17 values. Finally, we have also computed an index reflecting Th17/Treg ratio as zLnIL6+zLnIL17 - zlnIL-10 (zTh17/Treg). The latter ratio was strongly correlated with the first PC extracted from LnIL-6 and LnIL-17/LnIL10 (see table 2).

Age was significantly associated with zcholesterol/HDL ( $r=0.235$ ,  $p=0.10$ ,  $n=118$ ) and zLDL/HDL ( $r=0.239$ ,  $p=0.009$ ,  $n=118$ ), but not with the other z-unit weighted composite scores. The zLDL/HDL ratio was significantly higher in men than women ( $+0.49 \pm 1.35$  versus  $-0.24 \pm 1.29$ ;  $F=7.83$ ,  $df=1/116$ ,  $p=0.006$ ), but there were no significant sex differences

in the other z unit-weighted composite scores. Duration of illness was significantly and positively correlated with zcholesterol/HDL ( $r=0.266$ ,  $p=0.004$ ,  $n=118$ ) and zLDL/HDL ( $r=0.282$ ,  $p=0.002$ ,  $n=118$ ).

#### *Prediction of the EDSS score*

Correlation analyses showed significant relationships between the EDSS score and age ( $r=0.377$ ,  $p<0.001$ ), AOPP ( $r=0.190$ ,  $p=0.039$ ), homocysteine ( $r=0.332$ ,  $p<0.001$ ) and LDL-cholesterol ( $r=0.246$ ,  $p=0.008$ ) but not with the other biomarkers. There were significant correlations between the EDSS score and zcholesterol/HDL ( $r=0.291$ ,  $p=0.002$ ), zLDL/HDL ( $r=0.331$ ,  $p<0.001$ ), zTh17 ( $r=0.202$ ,  $p=0.037$ ) and zTh17/Treg ( $r=0.267$ ,  $p=0.006$ ). Consequently, we have used zTh17, zTh17/Treg, zcholesterol/HDL, zLDL/HDL, MetS and the significant biomarkers (see Table 1) together with age, sex and BMI as explanatory variables in GLM and binary logistic regression analyses. After defining the best model, we also examined the possible impact of the other biomarkers as well as demographic data (including ethnicity, diabetes mellitus, smoking and alcohol use) and the drug state of the MS patients.

Table 3 regression #1 shows the outcome of univariate GLM analysis with EDSS score as dependent variable and zTh17, zTh17/Treg, zcholesterol/HDL, zLDL/HDL, homocysteine, uric acid, AOPP, MetS together with age, sex and BMI as explanatory variables. The EDSS score was best predicted by age, zLDL/HDL, zTh17/Treg and homocysteine (all positively related) and BMI (inversely correlated). These variables independently predicted 36.3% of the variance in the EDSS scores. None of the other biomarkers yielded a significant effect, while sex ( $F=1.16$ ,  $df=1/95$ ,  $p=0.285$ ), ethnicity ( $F=2.11$ ,  $df=1/95$ ,  $p=0.150$ ), smoking ( $F=0.00$ ,  $df=1/95$ ,  $p=0.964$ ), alcohol use ( $F=1.48$ ,  $df=1/95$ ,  $p=0.227$ ), MetS ( $F=1.27$ ,  $df=1/94$ ,  $p=0.263$ ) and T2DM ( $F=0.03$ ,  $df=1/95$ ,  $p=0.860$ )

did not result in significant effects after considering the five variables entered in model regression #1. In order to examine whether the effects of these five significant predictors would change after controlling for the drug state of the patients we have entered the use of drugs as additional predictor variables, namely no drugs (n=7), IFN- $\beta$  (n=76), glatiramer (n=30) and natalizumab (n=7). There were only two patients taking fingolimod and therefore the latter was excluded from the analysis. Table 3 regression #2 shows that controlling for the drug state did not change the effects of zLDL/HDL, zTh17/Treg, homocysteine and age, although BMI was no longer significant.

Table 4 regression # 1 shows the outcome of binary logistic regression analysis with the group with EDSS  $\geq 3$  (*versus* those with EDSS  $< 3$ ) as dependent variables and MetS, age, sex and BMI as explanatory variables. We found that age (positively), MetS (positively) and BMI (inversely) significantly predicted high EDSS score with a Nagelkerke value of 0.294. After introducing zTh17, zTh17/Treg, zcholesterol/HDL, zLDL/HDL, homocysteine, uric acid and AOPP in the same analysis (regression #2), we found that age, zLDL/HDL and zTh17/Treg better predicted the EDSS score with a Nagelkerke value of 0.330. MetS (Wald=1.04, df=1, p=0.307) and BMI (Wald=2.31, df=1, p=0.128) were no longer significant in this regression analysis. Entry of the other variables in regression #2 (namely sex, ethnicity, smoking and alcohol use, T2DM, or the biomarkers CL-LOOH, uric acid, NO<sub>x</sub>, AOPP and carbonyl proteins) did not change the significance level of these three predictors and showed that none of these variables had a significant effect. Entering the drug state of the patients (four groups) as a categorical variable showed that the significances of zTh17/Treg, zLDL/HDL and age were unaffected, while the drug state had no significant effect.

#### *Results of neural network procedures*

Table 5 shows the results of two different MLP/NN models predicting EDSS scores (output variables) using the biomarkers and demographic or clinical data as input variables. In

MLP/NN model #1 we used the EDSS score as a scale variable (continuous variable) and biomarkers together with age, sex, BMI, MetS and duration of illness as input variables. Automatic architecture training of the MLP/NN delineated two hidden layers with three units in layer one (with hyperbolic tangent as activation function) and two units in layer two (with identity as activation factor for the output layer). The differences in sum of square error between the training and testing samples show that the MLP/NN model has learnt to generalize from the trend. The relative error was relatively stable across the training, testing and holdout samples. The predicted EDSS score was significantly and positively correlated with the actual EDSS score ( $r=0.616$ ,  $p<0.001$ ). Fig. 1A shows the relative and normalized importance of the input variables predicting the EDSS score. Homocysteine, zLDL/HDL and zTh17/Treg were the most important determinants of the predictive power of MLP/NN model #1, followed at a distance by duration of illness.

In MLP/NN model #2, Table 5, we trained the MLP/NN using the dichotomized EDSS score as output variable and the same input variables as in MLP/ NN model #1. Automatic architecture training model delineated two hidden layers with two units in layer one (activation function: hyperbolic tangent) and two units in layer two (activation factor in the output layer: softmax). The differences in cross-entropy error between the training and testing samples show that the model learnt to generalize from the trend. The rate of incorrect predictions was 21.2% in the training sample, 21.7% in the testing sample and 15.4% in the holdout sample. Table 5 shows also the partitioned confusion matrices. In the training sample, the sensitivity of the model was 92.0% and specificity 66.7%, while in the testing sample it was 93.3% and 50.0%, respectively. The accuracy of the holdout sample was somewhat better with a sensitivity of 94.4% and a specificity of 62.5%, whilst the AUC ROC curve was 0.842. Fig. 1B shows the relative and normalized importance of the input variables predicting the dichotomized EDSS score. As showed, zTh17/Treg, carbonyl proteins and age were the most

important determinants of the predictive power of high EDSS followed at a distance by homocysteine, MetS and LDL/HDL ratio.

## **Discussion**

The major finding of this study is that disability in MS patients is strongly associated with age, an inflammatory Th17 immune response profile, carbonyl proteins, as well as MetS, homocysteine and LDL/HDL ratio. This study established a model predicting increased risk towards high EDSS indicating that age, the LDL/HDL ratio (Castelli index 2) and a Th17/Treg profile are the most important features of disability independently of other confounding factors. Moreover, we used MLP/NN models to predict the EDSS score, both as a scale and a dichotomized variable, in MS patients and detected that of the top-6 features in each model 4 variables corresponded among both models, namely Th17/Treg, zLDL/HDL, homocysteine and age. Nevertheless, when we used the dichotomized EDSS score, also carbonyl protein was among the top features. Phrased differently, the cumulative effects of Th17 activation, a pro-atherogenic index, homocysteine, age and protein oxidation are important predictors.

Our data showing that patients with EDSS  $\geq 3$  were significantly older than those with EDSS  $< 3$  are in agreement with previous studies, which demonstrated an association between increased age and disability progression (Trojano et al. 2002; Scalfari et al. 2011). Previous studies show that many aspects of the clinical course of MS, including clinical symptoms (Tremlett et al. 2006), occurrence of relapses (Tremlett et al. 2008) and disability progression, are associated with age (Trojano et al. 2002; Confavreux and Vukusic 2006; Tremlett et al. 2006; Scalfari et al. 2011). Furthermore, a five-year follow-up progression in the EDSS demonstrated that increased age was a strong predictor of the EDSS and pyramidal dysfunction scores but was not significantly associated with the actual changes in the EDSS, pyramidal, sensitive, or cerebellar symptoms (Kallaur et al. 2016).

Initially, it was postulated that an imbalance between Th1 cytokines, such as interferon (IFN)- $\gamma$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and IL-2 and Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-10 was the major mediator of inflammation in the CNS in patients with MS (Sredni-Kenigsbuch 2002; Imitola et al. 2005; Langrish et al. 2005), which damages oligodendrocytes, myelin sheaths and neurons/axons, resulting in demyelination and axonal loss (Imitola et al. 2005). Further, mounting evidence showed the role of other CD4<sup>+</sup> T cell lineages in MS inflammatory mechanisms, such as Th17 and Treg cells through the production of IL-17, IL-21, IL-22, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by Th17 cells, and IL-10 and TGF- $\beta$  by Treg cells (Rostami and Ciric 2013). Reduced number and activity of Treg cells have been described in MS, creating an imbalance between the Th17/Treg cells and their cytokines (Hemmer et al., 2015; Sospedra and Martin 2016). Therefore, the demyelination and neurodegeneration that occur in the MS are driven by Th1/Th2 and Th17/Treg imbalance, which Th1 and Th17 cytokine profiles mediate the inflammatory damage mechanisms whereas Th2 and Treg cytokine profiles mediate a compensatory anti-inflammatory and protective mechanisms in MS (Hemmer et al., 2015; Sospedra and Martin 2016).

The role of the Treg response through IL-10 and TGF- $\beta$  cytokines is to dampen an overzealous inflammatory response caused by Th1 and Th17 immune responses. In the present study, the positive association between the z-unit weighted composite score  $z_{Th17/Treg}$  with moderate/severe disability in MS patients obtained in different statistical models (Table 4) underscores the important role of T17 cells in the pathophysiology of MS. Moreover, this result showed that the Treg-mediated anti-inflammatory response, by itself, was unable to restore the immune homeostasis and that this failure in the compensatory immune-regulatory reflex system (CIRS) as recently reviewed (Maes and Carvalho 2018) and, consequently, may result in an uncontrolled inflammation that contributed to the disability

and disease progression in this cohort of MS patients. Altogether, this result suggests that Th17/Treg score may be considered an important biomarker to predict the disability progression in MS patients.

Possibly, in different clinical forms of MS, or in different clinical phases, either Th1 or Th17 cells are the main drivers of pathological processes. This might also be the case in the evolution of individual CNS lesions, with one Th1 lineage initiates the pathologic mechanisms and Th17 lineage perpetuates them. Therefore, the Th17 cells will continue to be of intense interest for therapeutic targeting in MS and new approaches could be developed, hopefully with great benefit to MS patients (Rostami and Ciric 2013).

Moreover, the present study showed that higher levels of homocysteine were obtained in patients with moderate/severe disability than those with mild disability, underscoring the association between hyperhomocysteinemia and disease progression, independently of confounding factors, when MS patients were evaluated using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Oliveira et al. 2018). Hyperhomocysteinemia was also associated with the presence of MS (Ramsaransing et al. 2006; Moghaddasi et al. 2013), as well as with high disability (Guzel et al. 2016). Homocysteine is known to be toxic to the CNS and hyperhomocysteinemia may be a risk factor for neurodegenerative conditions (Seshadri 2006; Zhu et al. 2011). The CNS may be particularly sensitive to extracellular homocysteine, as it promotes excitotoxicity via stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA), and damages neuronal DNA, thereby triggering apoptosis (Ho et al. 2002; Škovierová et al. 2015). Different mechanisms are involved in the neurotoxic effect of homocysteine on neuronal and glial cells (Škovierová et al. 2015; Škovierová et al. 2016; Longoni et al. 2018). On neuronal cells, homocysteine acts as an agonist for both groups of glutamate receptors, NMDA and non-NMDA, and the overstimulation of these receptors results in increased level of cytoplasmic calcium, higher production of free radicals and activation of caspases leading to

apoptosis (Škovierová et al. 2016). Moreover, homocysteine promotes oxidative stress. An *in vitro* effect of homocysteine in rat hippocampus showed that it significantly increases lipid peroxidation parameter and decreases total antioxidant plasma capacity, both in a dose-dependent manner, but did not change antioxidant enzymes (Streck et al. 2003). On glial cells, hyperhomocysteinemia *in vitro* showed to be a potent gliotoxic agent capable of inducing the death of human glial cells already at concentrations reached in brain during hyperhomocysteinemia (Škovierová et al. 2015). Moreover, homocysteine induced in adult astrocytes changes in cellular morphology/cytoskeleton proteins, pro-inflammatory TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 cytokines release, cellular antioxidant defenses, nuclear factor  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) transcriptional activity, and heme oxygenase 1 (HO-1) expression levels (Longoni et al. 2018). Therefore, it is conceivable to suggest that association between hyperhomocysteinemia and increased disability and progression of the disease may be explained by direct neurotoxic effects of homocysteine via excitotoxic mechanism thereby contributing to neurodegeneration.

The results of the current study also showed that the presence of MetS and increased levels of LDL-cholesterol were significantly associated with moderate/severe disability. MetS is a global public health challenge and a complex condition represented by a combination of risk factors, such as central obesity, dyslipidemia, hypertension, and disturbed glucose metabolism, a cluster of interconnected factors which lead to an increased risk of cardiovascular diseases and T2DM (Reaven 1997; Kassi et al. 2011). Previous research has shown that the prevalence of MetS is higher than national averages for individuals with autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus (Versini et al. 2014). However, conflicting results are also reported, such as that the rate of 30% of MetS obtained in a sample of 130 MS patients with moderate/severe disability (EDSS score  $\geq$  3),

with no gender difference, did not differ from the general population (Pinhas-Hamiel et al. 2015).

A prospective cohort design in patients with MS found that high levels of total cholesterol were associated with increased disability, and increased total cholesterol/HDL ratio was associated with annual accumulating disability (Tettey et al. 2014). A placebo-controlled trial carried out with MS patients showed that those using lipid-lowering statins had a lower change in EDSS after two years than the placebo group (Chataway et al. 2013). Further, these authors showed that, compared with placebo, simvastatin 80 mg per day reduced the annualized rate of whole-brain atrophy (the primary outcome) by 43.0%, considered a positive effect given that longitudinal studies have shown a relation between atrophy progression and disability. These authors also noted a small, but significant, effect in two the secondary clinical outcomes, such as the mean score at 24 months of EDSS evaluated by a physio and multiple sclerosis impact scale 29 (MSIS-29) by a patient reported viewpoint, supporting a true effect of dyslipidemia on disease progression (Chataway et al. 2014).

Regarding the lipid profile of the present cohort of MS patients, our results are in agreement with the findings that patients with acute transverse myelitis (ATM) and patients with MS showed higher serum triglycerides, total cholesterol, and LDL-cholesterol levels than healthy controls. Moreover, longer disease duration was associated with high triglycerides while high HDL-cholesterol was associated with a trend toward low disability scores (Liu et al. 2016).

Mounting evidence indicates that serum cholesterol and other risk factors for cardiovascular diseases intensify normative trajectories of age-related cognitive decline and may have impact on brain networks (Spielberg et al. 2017). These authors demonstrated a deleterious effect of cholesterol on brain health and suggested that cholesterol accelerates the

impact of age on neural trajectories by disrupting connectivity in circuits implicated in integrative processes and behavioral control (Spielberg et al. 2017).

Some lines of evidence also indicates that nitro-oxidative stress plays a major role in the pathogenesis of MS by contributing to myelin and oligodendroglia degeneration (Ferretti et al. 2005). We previously demonstrated that individuals with MS have persistent oxidative stress, even when the disease remained in clinical remission, and that oxidative stress may play an important role in the physiopathology of disability progression (Oliveira et al. 2012). Increased AOPP and progression of MS were significantly and positively associated with increase of ferritin; furthermore, the combination of serum ferritin levels and oxidative stress markers were responsible for 13.9% of the MS diagnosis and the results suggested that ferritin could aggravate oxidative stress in patients with MS and contribute to progression of disease (Ferreira et al. 2017).

Our results showed that AOPP was higher in MS with moderate/severe disability ( $EDSS \geq 3$ ) than those with mild disability ( $EDSS < 3$ ), while carbonyl proteins was associated with the dichotomized EDSS score. Differences between both indices of protein oxidation may be explained by differences in formation. AOPP, a group of oxidatively modified proteins that contain pentosidine, dityrosine and carbonyls, is formed as a consequence of hypochlorous acid stress which may proceed via elevated activity of myeloperoxidase coupled with increased peroxide and peroxynitrite production (Huang et al. 2013; Gryszczyńska et al. 2017). The formation of protein carbonyl is earlier than the AOPP and is the consequence of many more oxidative processes and therefore reflects overall oxidation of proteins (Weber et al. 2015; Gryszczyńska et al. 2017). Carbonylation refers to the non-enzymatic addition of aldehydes or ketones to specific amino acid residues and constitutes the most common oxidative modification of proteins affecting the function and/or metabolic stability of the modified proteins (Levine 2002). While AOPP is an irreversible process,

carbonylation is a reversible one. The formation of protein carbonyls seems to be a common phenomenon during oxidation, and their quantification can be used to measure the extent of oxidative modification (Dalle-Donne et al. 2003).

Our previous study showed that RRMS patients exhibited higher plasma levels of lipid peroxidation (CL-LOOH) and carbonyl proteins, while lower plasma levels of NO<sub>x</sub>, TRAP, and sulfhydryl (SH) groups than controls. Moreover, patients with moderate/severe disability showed higher CL-LOOH than controls and a positive correlation was observed between CL-LOOH and EDSS, as well as between carbonyl proteins and EDSS (Oliveira et al. 2012). Previous findings also showed that plasma and cerebrospinal fluid AOPP levels were higher and SH group levels were lower in patients with clinically isolated syndrome (CIS) and with RRMS than those obtained in controls. Furthermore, regarding to disability of patients with CIS and RRMS, plasma and cerebrospinal fluid AOPP levels were positively correlated with EDSS, while SH group levels was inversely correlated with EDSS (Ljubisavljevic et al. 2013). Taken together, these results suggest that oxidative and nitrosative stress pathways could be possible new targets of integrative therapies for patients with MS.

Carbonylation of brain proteins has been implicated in the etiology and/or progression of several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease (Aksenov et al. 2001), Parkinson's disease (Floor and Wetzel 2002), amyotrophic lateral sclerosis (Ferrante et al. 1997), as well as MS (Bizzozero et al. 2005; Zheng and Bizzozero 2010). Elevated levels of carbonyl proteins are generally a sign not only of oxidative stress but also of disease-derived protein dysfunction and the assay of carbonyl protein has a major advantage over lipid peroxidation products as markers of oxidative stress because oxidized proteins are generally more stable (Floor and Wetzel 2002). Moreover, a positive correlation was observed between carbonyl group level and disability in SPMS patients (Morel et al. 2017).

We have shown previously that the immune-inflammatory and oxidative stress mechanisms, as well as the *TNF $\beta$*  +252 G/A (rs909253) genetic variant play a role in the pathophysiology of MS and disease progression and that biomarkers of these pathways are predictors of high disability and are associated with different aspects of disease progression (Kallaur et al. 2017). We demonstrated that IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , AOPP, and NO<sub>x</sub> levels were higher while IL-4 was lower in MS patients with moderate/severe disability compared with those with mild disability. The actual accumulating disability observed during five-year follow-up were positively associated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ . In that study, increased IFN- $\gamma$  values were associated with high pyramidal symptoms, increased IL-6 with sensitive symptoms while increased carbonyl protein and IL-10 but lowered albumin levels predicted cerebellar symptoms. Moreover, the TNFB1/B2 genotype of *TNF $\beta$*  +2552 G/A (rs909253) variant decreased the risk towards progression of pyramidal symptoms (Kallaur et al. 2017).

## **Conclusions**

To our knowledge, no studies have evaluated the association between Castelli indices 1 and 2 surrogates, such as total cholesterol/HDL-cholesterol ratio and LDL/HDL ratio, respectively, as well as the association between IM&NO biomarkers and MS disability. The results demonstrated here underscore that IM&NO pathways play a key role in increased disability in MS patient and may be possible new targets for the treatment of them. Moreover, the results contribute to the identification of a laboratory biomarker panel that may be used in predicting the disability in MS patients.

## **Compliance with ethical standards**

### *Conflict of interest*

The authors declare that they have no conflict of interest.

### *Ethical approval*

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.

### **Financial support**

This study was partially and financially supported by Novartis Biosciences S.A for the development of the research according to the Researcher's Initiative Study CFTY720DBR07T. The authors do not receive any reimbursement or financial benefits and declare that they have no competing interests. Novartis Biosciences S.A. played no role in the design, methods, data management or analysis or in the decision to publish. The study was also supported by grants from 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).

### **Author's contributions**

**Conception and research design:** Edna Maria Vissoci Reiche and Andrea Name Colado Simão; **Manuscript writing and discussion of results:** Edna Maria Vissoci Reiche, Andrea Name Colado Simão; Tamires Flauzino; **Data collection:** Damacio Ramón Kaimen-Maciél, Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira, Tamires Flauzino, Daniela Frizon Alfieri, Ana Paula Kallaur, and Sayonara Rangel Oliveira, which contributed equally; **Laboratory analysis:** Tamires Flauzino, Daniela Frizon Alfieri, Marcell Alysson Batisti Lozovoy;

**Statistical analysis:** Andrea Name Colado Simão, Michael Maes. All authors have read and approved the final manuscript.

## References

- Aksenov MY, Aksenova MV, Butterfield DA, et al (2001) Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 103:373–383. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00580-7
- Altman DG, Royston P (2006). The cost of dichotomising continuous variables. *BMJ* 6;332(7549):1080.
- American Diabetes Association (2014) Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S14-80. doi: 10.2337/dc14-S014
- Bizzozero OA, DeJesus G, Callahan K, Pastuszyn A (2005) Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81:687–695. doi: 10.1002/jnr.20587
- Bonetti F, Brombo G, Zuliani G (2016) The relationship between hyperhomocysteinemia and neurodegeneration. *Neurodegener Dis Manag* 6:133–145. doi: 10.2217/nmt-2015-0008
- Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, et al (2013) THE MS-STAT TRIAL: High Dose Simvastatin Slows Brain Atrophy and Delays Disability in Secondary Progressive Multiple Sclerosis: A Phase II Placebo-Controlled Trial (PL02.001). *Neurology* 80
- Chataway J, Schuerer N, Alsanousi A, et al (2014) Effect of high-dose simvastatin on brain atrophy and disability in secondary progressive multiple sclerosis (MS-STAT): A randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet* 383:2213–2221. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62242-4
- Confavreux C, Vukusic S (2006) Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 129:595–605. doi: 10.1093/brain/awh714
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, et al (2003) Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 9:169–176. doi: 10.1016/S1471-4914(03)00031-5

- Das Sarma J, Ciric B, Marek R, et al (2009) Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation* 6:1–12. doi: 10.1186/1742-2094-6-14
- Dichi I, Breganó JW, Simão ANC, Cecchini R (2014) *Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases*. FL: CRC Press, Boca Raton
- Faeh D, Chiolero A, Paccaud F (2006) Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? *Swiss Med Wkly* 136:745–56. doi: 2006/47/smw-11283
- Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu L a, et al (1997) Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 69:2064–74. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69052064.x
- Ferreira KPZ, Oliveira SR, Kallaur AP, et al (2017) Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 373:236–241. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.039
- Ferretti G, Bacchetti T, Principi F, et al (2005) Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 11:677–682. doi: 10.1191/1352458505ms1240oa
- Floor E, Wetzel MG (2002) Increased Protein Oxidation in Human Substantia Nigra Pars Compacta in Comparison with Basal Ganglia and Prefrontal Cortex Measured with an Improved Dinitrophenylhydrazine Assay. *J Neurochem* 70:268–275. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010268.x
- Gonzalez Flecha B, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100
- Graber JJ, Ford D, Zhan M, et al (2007) Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: Correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 185:168–174. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.01.011

- Grysczyńska B, Formanowicz D, Budzyń M, Wanic-Kossowska M, Pawliczak E, Formanowicz P, Majewski W, Strzyżewski KW, Kasprzak MP, Iskra M (2017) Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *Biomed Res Int* 2017:4975264.
- Grundey SM, Cleeman JI, Daniels SR, et al (2005) Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 112:2735–2752. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.169404
- Guzel I, Mungan S, Oztekin ZN, Ak F (2016) Is there an association between the Expanded Disability Status Scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? *J Chinese Med Assoc* 79:54–57. doi: 10.1016/j.jcma.2015.08.010
- Haas J, Hug A, Viehöver A, et al (2005) Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35:3343–3352. doi: 10.1002/eji.200526065
- Ho PI, Ortiz D, Rogers E, Shea TB (2002) Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: Glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. *J Neurosci Res* 70:694–702. doi: 10.1002/jnr.10416.
- Huang Y, Wu Z, Riwanto M, Gao S, et al (2013) Myeloperoxidase, paraoxonase-1, and HDL form a functional ternary complex. *J Clin Invest* 123(9):3815-3828.
- IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the population and households: results of the universe. [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
- Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ (2005) Cytokines in multiple sclerosis: From bench to bedside. *Pharmacol Ther* 106:163–177. doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.11.007

- Kallaur AP, Lopes J, Oliveira SR, et al (2016) Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers of Depression Symptoms in Subjects with Multiple Sclerosis: Increased Peripheral Inflammation but Less Acute Neuroinflammation. *Mol Neurobiol* 53:5191–5202. doi: 10.1007/s12035-015-9443-4
- Kallaur AP, Reiche EMV, Oliveira SR, et al (2017) Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 54:31–44. doi: 10.1007/s12035-015-9648-6
- Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, et al (2006) Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood* 107:591–593. doi: 10.1182/blood-2005-06-2506
- Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G (2011) Metabolic syndrome: Definitions and controversies. *BMC Med* 9:48. doi: 10.1186/1741-7015-9-48
- Kolbinger F, Huppertz C, Mir A, Padova F (2016) IL-17A and Multiple Sclerosis: Signaling Pathways, Producing Cells and Target Cells in the Central Nervous System. *Curr Drug Targets* 17:1882–1893. doi: 10.2174/1389450117666160307144027
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–52
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, et al (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233–240. doi: 10.1084/jem.20041257
- Levine RL (2002) Oxidatively Modified Proteins in Aging and Disease. *Free Radic Biol Med* 32:790–796. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00765-7
- Liu J, Li M, Wang X, et al (2016) Elevated lipid profiles in patients with acute transverse myelitis. *Eur Neurol* 75:142–148. doi: 10.1159/000444710
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, et al (2013) The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. *Neurochem Int* 62:988–997. doi: 10.1016/j.neuint.2013.02.025

- Longoni A, Bellaver B, Bobermin LD, et al (2018) Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. *Mol Neurobiol* 55:1966–1976. doi: 10.1007/s12035-017-0463-0
- Maes M, Carvalho AF (2018) The Compensatory Immune-Regulatory Reflex System (CIRS) in Depression and Bipolar Disorder. *Mol Neurobiol* 55: 8885-8903. doi: 10.1007/s12035-018-1016-x
- Marrie RA, Rudick R, Horwitz R, et al (2010) Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. *Neurology* 74:1041–1047. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181d6b125
- Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N, et al (2013) Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: A case control study. *Clin Neurol Neurosurg* 115:1802–1805. doi: 10.1016/j.clineuro.2013.05.007
- Morel A, Bijak M, Niwald M, et al (2017) Markers of oxidative/nitrative damage of plasma proteins correlated with EDSS and BDI scores in patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Redox Rep* 22:547–555. doi: 10.1080/13510002.2017.1325571
- Murphy ÁC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KHG (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 24:641–651. doi: 10.1016/j.bbi.2010.01.014
- Naggara O, Raymond J, Guilbert F, Roy D, Weill A, Altman DG. (2011) Analysis by categorizing or dichotomizing continuous variables is inadvisable: an example from the natural history of unruptured aneurysms. *AJNR Am J Neuroradiol.* 32(3):437-40.
- Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679–681. doi: 10.1515/CCLM.2008.096
- Oliveira SR, Colado Simão AN, Kallaur AP, et al (2014) Disability in patients with multiple sclerosis: Influence of insulin resistance, adiposity, and oxidative stress. *Nutrition* 30:268–273. doi: 10.1016/j.nut.2013.08.001

- Oliveira SR, Flauzino T, Sabino BS, et al (2018) Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis.* doi: 10.1007/s11011-018-0224-4
- Oliveira SR, Kallaur AP, Simão ANC, et al (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 321:49–53. doi: 10.1016/j.jns.2012.07.045
- Pinhas-Hamiel O, Livne M, Harari G, Achiron A (2015) Prevalence of overweight, obesity and metabolic syndrome components in multiple sclerosis patients with significant disability. *Eur J Neurol* 22:1275–1279. doi: 10.1111/ene.12738
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366
- Ramsaransing GSM, Fokkema MR, Teelken A, et al (2006) Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:189–92. doi: 10.1136/jnnp.2005.072199
- Reale M, Sanchez-Ramon S (2017) Lipids at the Cross-road of Autoimmunity in Multiple Sclerosis. *Curr Med Chem* 24:176–192. doi: 10.2174/0929867324666161123093606
- Reaven GM (1997) Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Nutrition* 13:65; discussion 64, 66
- Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:357–363. doi: 10.1016/S0076-6879(94)33041-7
- Rostami A, Ciric B (2013) Role of Th17 cells in the pathogenesis of CNS inflammatory demyelination. *J Neurol Sci* 333:76–87. doi: 10.1016/j.jns.2013.03.002
- Russo C, Morabito F, Luise F, et al (2008) Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol* 255:64–69. doi: 10.1007/s00415-007-0668-7
- Sayre LM, Perry G, Smith M a (2008) Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172–188. doi: 10.1021/tx700210j

- Scalfari A, Neuhaus A, Daumer M, et al (2011) Age and disability accumulation in multiple sclerosis. *Neurology* 77:1246–1252. doi: 10.1212/WNL.0b013e318230a17d
- Seshadri S (2006) Elevated plasma homocysteine levels: Risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? *J Alzheimer's Dis* 9:393–398. doi: 10.3233/JAD-2006-9404
- Škovierová H, Mahmood S, Blahovcová E, et al (2015) Effect of homocysteine on survival of human glial cells. *Physiol Res* 64:747–754
- Škovierová H, Vidomanová E, Mahmood S, et al (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. *Int J Mol Sci* 17:1–18. doi: 10.3390/ijms17101733
- Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683–747. doi: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707
- Sospedra M, Martin R (2016) Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 36: 115-127. doi: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0036-1579739>.
- Spielberg JM, Sadeh N, Leritz EC, et al (2017) Higher serum cholesterol is associated with intensified age-related neural network decoupling and cognitive decline in early- to mid-life. *Hum Brain Mapp* 38:3249–3261. doi: 10.1002/hbm.23587
- Streck EL, Vieira PS, Wannmacher CM, Dutra-Filho CS, Wajner M, Wyse AT: In vitro effect of homocysteine on some parameters of oxidative stress in rat hippocampus. *Metab Brain Dis* 18: 147-154, 2003.
- Sredni-Kenigsbuch D (2002) Th1/Th2 cytokines in the central nervous system. *Int J Neurosci* 112:665–703. doi: 10.1080/00207450290025725
- Suarez-Kurtz G, Pena SDJ, Struchiner CJ, Hutz MH (2012) Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. *Front Pharmacol* 3:1–7. doi: 10.3389/fphar.2012.00191
- Tettey P, Simpson S, Taylor B, et al (2014) An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. *Mult Scler J* 20:1737–1744. doi: 10.1177/1352458514533162

- Teunissen CE, Killestein J, Kragt JJ, et al (2008) Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1349–1353. doi: 10.1136/jnnp.2008.151555
- Tremlett H, Paty D, Devonshire V (2006) Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurology* 66:172–177
- Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, et al (2008) Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1368–1374. doi: 10.1136/jnnp.2008.145805
- Trojano M, Liguori M, Bosco Zimatore G, et al (2002) Age-related disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 51:475–480. doi: 10.1002/ana.10147
- Versini M, Jeandel PY, Rosenthal E, Shoenfeld Y (2014) Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. *Autoimmun Rev* 13:981–1000. doi: 10.1016/j.autrev.2014.07.001
- Weber D, Davies MJ, Grune T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol* 5:367–380.
- Weinstock-Guttman B, Zivadinov R, Mahfooz N, et al (2011) Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 8:127. doi: 10.1186/1742-2094-8-127
- Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524–32. doi: 0022-1767/98
- Zheng J, Bizzozero OA (2010) Accumulation of protein carbonyls within cerebellar astrocytes in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 88:3376–3385. doi: 10.1002/jnr.22488
- Zhu Y, He ZY, Liu HN (2011) Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B12, folate, and multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 18:933–938. doi: 10.1016/j.jocn.2010.12.022

**Table 1 Clinical, demographic and biomarker characteristics of patients with multiple sclerosis categorized according to their disability evaluated using Expanded Disability Scale Score (EDSS)**

Variable	EDSS <3 (n= 49)	EDSS ≥3 (n=70)	F/X <sup>2</sup>	df	P value
EDSS	0.99 (0.85)	4.79 (1.56)	239.69	1/117	<0.001
Age (years)	37.3 (11.3)	46.8 (12.3)	18.51	1/117	<0.001
Sex (F/M)	35 (71.4)/14 (28.6)	46 (65.7)/24 (34.3)	0.43	1	0.511
Caucasian/Non-Caucasian	41 (83.7)/8 (16.3)	55 (78.6)/15 (21.4)	0.48	1	0.488
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.0 (5.3)	25.7 (4.9)	0.14	1/117	0.707
Waist circumference (cm)	88.4 (13.4)	92.5 (13.1)	2.77	1/112	0.099
Smoking (No/Yes)	45 (91.8)/4 (8.2)	59 (84.3)/11 (15.7)	1.49	1	0.222
Alcohol use (No/Yes)	42 (85.7)/7 (14.3)	63 (90.0)/7 (10.0)	0.51	1	0.475
T2DM (No/Yes)	46 (93.9)/3 (6.1)	63 (90.0)/7 (10.0)	0.56	1	0.453
MetS (No/Yes)	43 (87.8)/6 (12.2)	42 (61.8)/26 (38.2)	9.68	1	0.002
Glucose mg/dL	89.6 (2.8)	90.3 (2.3)	0.03	1/117	0.855
Total cholesterol mg/dL	182.9 (6.0)	195.0 (5.1)	2.37	1/114	0.127
Triglycerides (mg/dL)	108.6 (8.7)	13.4 (7.6)	1.62	1/114	0.205
HDL-cholesterol (mg/dL)	58.2 (18.5)	50.9 (17.1)	4.45	1/113	0.037
LDL-cholesterol (mg/dL)	102.9 (33.4)	119.2 (33.1)	6.78	1/113	0.010
Uric acid (mg/dL)	3.82 (1.06)	4.31 (1.35)	4.53	1/113	0.035
Homocysteine (μmol/L)	11.4 (2.9)	13.3 (4.7)	5.82	1/114	0.017
Hydroperoxide (cpm)	174 (91)	176 (92)	0.05	1/116	0.829
Carbonyl Protein (nmol mL <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> total protein)	3.07 (1.34)	3.29 (1.20)	0.84	1/116	0.362
AOPP (μmol/L of chloramine-T equivalents)	118.7 (41.2)	136.7 (48.6)	5.13	1/116	0.025
NOx (μM)	11.7 (3.7)	13.2 (3.7)	0.39	1/116	0.533
IL-6 (pg/mL)	22.2 (79.7)	19.7 (93.6)	1.14	1/105	0.289
IL-17 (pg/mL)	11.2 (19.9)	27.0 (122.3)	0.82	1/105	0.367
IL-10 (pg/mL)	22.3 (62.2)	26.8 (117.2)	0.05	1/105	0.819
Clinical form			12.040	1	0.001

RRMS	48 (97.9)	52 (74.3)
ProgMS (PPMS + SPMS)	1 (2.1)	18 (25.7)

---

EDSS: Expanded Disability Status Scale; EDSS < 3: mild disability; EDSS ≥ 3.0: moderate/high disability; F/X<sup>2</sup>: the results of analyses of variance.  $\chi^2$ : results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as mean and  $\pm$  standard deviation (SD) and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). df: degree of freedom; BMI: body mass index; T2DM: type 2 diabetes mellitus; MetS: metabolic syndrome; AOPP: advanced oxidation protein product; NOx: nitric oxide metabolites; IL: interleukin; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein cholesterol; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; ProgMS: progressive clinical forms of multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis

**Table 2 Description of the z-unit weighted composite scores of inflammatory and metabolic biomarkers used in the present study**

<b>z-unit score</b>	<b>Index</b>	<b>Correlation</b>
zcholesterol/HDL	Castelli risk index 1	r=0.955, p<0.001, n=118
zLDL/HDL	Castelli risk index 2	r=0.944, p<0.001, n=118
zTh17 profile	PC IL-6 and IL-17 (Th17 profile)	r=1.000, p<0.001, n=110
zTh17/Treg	PC IL-6 and IL-17/IL-10 (Treg profile)	r=0.701, p<0.001, n=110

— *zcholesterol/HDL: z value of total cholesterol - high-density lipoprotein cholesterol; zLDL/HDL: z value of low-density lipoprotein cholesterol - high-density lipoprotein cholesterol; zTh17profile: z natural logarithmic (Ln) of interleukin (IL)-6 (zLnIL-6) + zLnIL-17; zTh17/Treg: zLnIL6 + zLnIL17 – zLnIL-10; PC: principal component; Treg: T regulatory cells.*

**Table 3 Results of univariate general linear model (GLM) analysis with Expanded Disability Scale Score as dependent variable and immune-inflammatory, metabolic, and oxidative stress biomarkers as explanatory variables**

Regression	Explanatory variables	F	df	p value	R <sup>2</sup>	F	df	P value	R <sup>2</sup>
#1	Age (+)	12.25	1/96	0.001	0.113	10.92	5/96	<0.001	0.363
	BMI (-)	5.28	1/96	0.024	0.052				
	zLDL/HDL (+)	5.31	1/96	0.023	0.052				
	zTh17/Treg (+)	11.08	1/96	0.01	0.103				
	Homocysteine (+)	7.30	1/96	0.008	0.071				
#2	Age (+)	10.30	1/91	0.002	0.102	9.50	8/91	<0.001	0.455
	BMI	1.30	1/91	0.257	0.014				
	zLDL/HDL (+)	9.81	1/91	0.002	0.097				
	zTh17/Treg (+)	5.11	1/91	0.026	0.053				
	Homocysteine (+)	7.42	1/91	0.008	0.075				
	Drug state	5.37	1/91	0.002	0.150				

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; BMI: body mass index; *Treg*: *T* regulatory cells; *zLDL/HDL*: *z* value of low-density lipoprotein cholesterol - high-density lipoprotein cholesterol; *zTh17/Treg*: *z* natural logarithmic value of interleukin (IL) 6 + *z* natural logarithmic value of IL17 – *z* natural logarithmic value of IL-10; (-): negatively associated; (+): positively associated.

**Table 4 Result of binary logistic regression analysis with an increased EDSS score ( $\geq 3$ ) as dependent variable and those with lower EDSS score ( $< 3$ ) as reference group**

Regression	Explanatory Variables	Wald	df	P value	OR	CI 95%	X <sup>2</sup>	df	P value	Nagel
#1	Age (+)	11.23	1	0.001	1.07	1.03 – 1.11	28.16	3	<0.001	0.294
	MetS (+)	6.84	1	0.009	5.42	1.53 – 19.20				
	BMI (-)	4.20	1	0.040	0.90	0.82 – 0.99				
#2	Age (+)	7.68	1	0.006	1.07	1.03 – 1.11	29.23	3	<0.001	0.330
	zLDL/HDL (+)	5.08	1	0.024	1.69	1.17 – 2.45				
	zTh17/Treg (+)	7.18	1	0.007	1.78	1.08 – 2.93				
#3	Age (+)	8.71	1	0.003	1.07	1.02 – 1.11	36.77	6	<0.001	0.407
	zLDL/HDL (+)	9.99	1	0.002	1.99	1.30 – 3.04				
	zTh17/Treg (+)	3.89	1	0.049	1.69	1.00 – 2.85				
	Drug state	1.18	3	0.759	-	-				

df: degree of freedom; OR: odds ratio; CI: confidence interval; MetS: metabolic syndrome; BMI: body mass

index; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; Treg: T regulatory cells

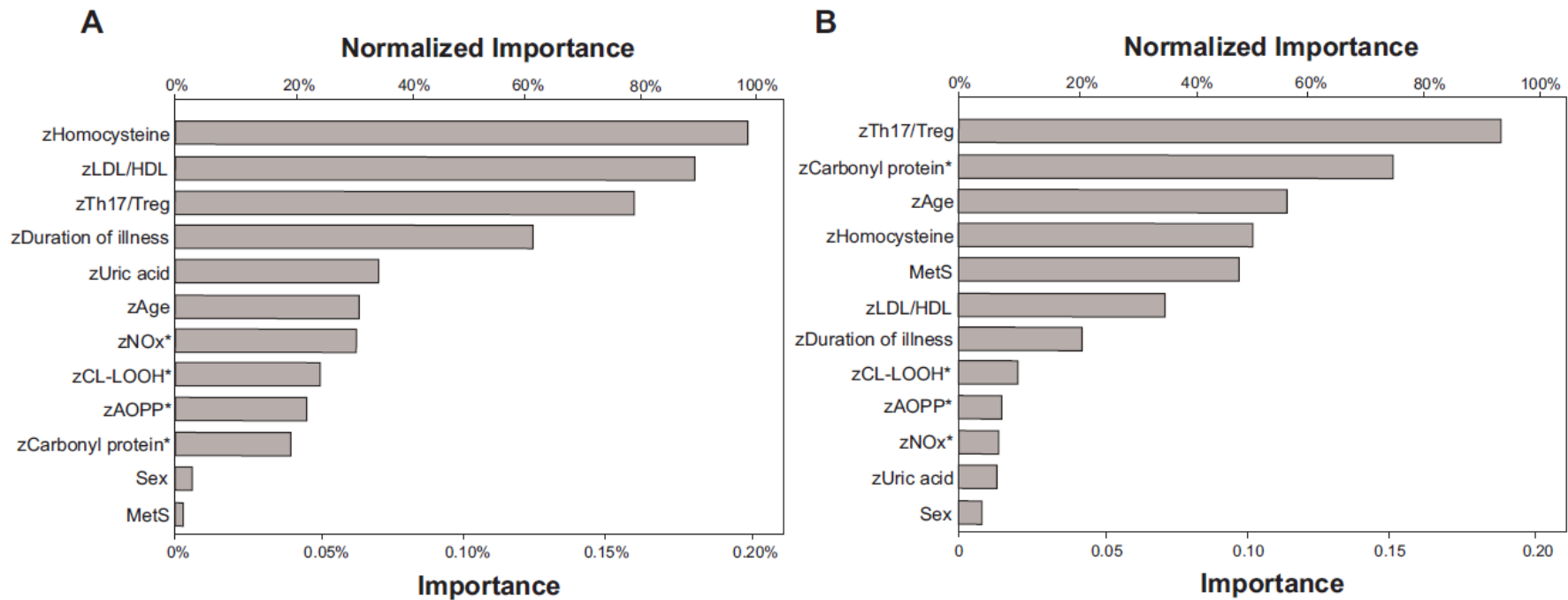
zLDL/HDL: z value of low-density lipoprotein cholesterol – z value of high-density lipoprotein cholesterol;

zTh17/Treg: z natural logarithmic (Ln) value of interleukin (IL) 6 + z Ln value of IL17 – z Ln value of IL-10

**Table 5 Multilayer Perceptron (MLP) Neural Network (NN) models with the EDSS score (continuous or dichotomized variable) as output variables and age, sex, duration of illness, metabolic syndrome and IM&NO biomarkers as input variables**

NN models	Model	NN #1	NN #2
	Output	Scale EDSS	EDSS $\geq 3$
	Input	All (n=14 variables)	All (n=14 variables)
	SS/CE error	1.418	27.356
Training	Relative error or % incorrect	0.644	21.2%
	prediction (sensitivity-specificity)	-	(92.0% – 66.7 %)
	SS/CE error	0.602	10.337
Testing	Relative error or % incorrect	0.669	21.7%
	prediction (sensitivity-specificity)	-	(93.3% – 50.0%)
Holdout	Relative error or % incorrect	0.653	15.4%
	prediction (sensitivity-specificity)	-	(94.4% – 62.5%)
	AUC ROC	-	0.842

EDSS: Expanded Disability Status Scale; IM&NO: immune-inflammatory, metabolic, and oxidative stress biomarkers; AUC ROC: area under the receiving operating curves; SS/CE: sum of squares or cross-entropy error.



**Fig. 1** Results of two different multilayer perceptron (MLP) neural network (NN) models of analysis showing the relative and normalized importance of the input variables predicting the disability using Expanded Disability Scale Score (EDSS). **A:** Model #1 used EDSS as continuous variable and immune-inflammatory, metabolic and oxidative stress biomarkers, together with age, sex, body mass index, metabolic syndrome (MetS), and duration of illness as input variables. As showed, the homocysteine, zLDL/HDL and zTh17/Treg were the most important determinants of the predictive power of MLP/NN model #1, followed at a distance by duration of illness. **B:** Model #2 used dichotomized EDSS (EDSS <3 and EDSS  $\geq$ 3) as output variable and the same input variables as in MLP/ NN model #1. As showed, zTh17/Treg, carbonyl proteins and age were the most important determinants of the predictive power of higher EDSS followed at a distance by homocysteine, MetS and LDL/HDL ratio. \*z-scores obtained on Ln transformations. AOPP: advanced oxidation protein product; NOx: nitric oxide metabolites; CL-LOOH: hydroperoxide; Treg; T regulatory; HDL: high-density lipoprotein cholesterol; LDL: low-density lipoprotein cholesterol.

## 5.2 ARTIGO 2

**The rs3761548 *FOXP3* variant is associated with multiple sclerosis and transforming growth factor  $\beta$ 1 levels in female patients**

Tamires Flauzino<sup>1</sup>, Daniela Frizon Alfieri<sup>1</sup>, Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira<sup>1,2</sup>, Sayonara Rangel Oliveira<sup>3</sup>, Ana Paula Kallaur<sup>1</sup>, Marcell Alysson Batisti Lozovoy<sup>1,3</sup>, Damacio Ramón Kaimen-Maciel<sup>4</sup>, Karen Brajão de Oliveira<sup>5</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>1,3</sup>, Edna Maria Vissoci Reiche<sup>1,3</sup>

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

<sup>2</sup>Outpatient Clinic for Neurology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>3</sup>Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University of Londrina, Paraná, Brazil

<sup>4</sup>Hospital Santa Casa de Misericórdia de Londrina; Londrina, Paraná, Brazil;

<sup>5</sup>Laboratory of Molecular Genetics and Immunology, Department of Pathological Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

**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, CEP 86038-350, Londrina, Paraná, Brazil; E-mail: reiche@sercomtel.com.br, Tel/Fax: +55 43 3371 2619. ORCID: 0000-0001-6507-2839

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the association between rs37611548 *FOXP3* (-3279 C>A) variant and multiple sclerosis (MS) diagnosis, disability, disability progression, as well as transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and interleukin (IL)-10 plasma levels in MS patients. The study included 170 MS patients and 182 controls, adults, both sexes. Disability was evaluated using Expanded Disability Status Scale (EDSS) and categorized as mild (EDSS $\leq$ 3) and moderate/high (EDSS>3). Disability progression was evaluated using Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). The rs37611548 variant was determined with polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Plasma levels of TGF- $\beta$ 1 and IL-10 were determined using immunofluorimetric assay. CA and AA genotypes were associated with MS [odds ratio (OR): 2.03, 95% confidence interval (CI): 1.66-3.53,  $p=0.012$ ; OR: 8.19, 95%CI: 3.04-22.07,  $p<0.001$ , respectively]. With the dominant model, the CA+AA genotypes were associated with MS (OR: 2.57, 95% CI: 1.50-4.37,  $p<0.001$ ). In the recessive model, the AA genotype was also associated with MS (OR: 5.38, 95% CI: 2.12-13.64,  $p<0.001$ ). After adjustment by age, ethnicity, BMI and smoking, all these results remained significant, as well as female patients carrying the CA+AA genotypes showed higher TGF- $\beta$ 1 than those carrying the CC genotype (OR: 1.35, 95%CI: 1.001-1.054,  $p=0.043$ ). No association was observed between the genotypes and disability, disability progression and IL-10 levels. These results suggest that the A allele of *FOXP3* -3279 C>A variant may exert a role in the T regulatory cell function, which could be one of the factors involved in the susceptibility for MS in females.

**Keywords:** Multiple sclerosis; disability; rs37611548 *FOXP3* variant; transforming growth factor  $\beta$ 1; T regulatory cell.

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a progressive chronic inflammatory disorder of the central nervous system (CNS) which molecules in the white matter and grey matter of the brain, spinal cord, and optic nerve are attacked by immune-mediated mechanisms [1]. The pathogenesis of MS involves complex interactions between genetic susceptibility and environmental triggers, as well as gene-environment interactions and epigenetic mechanisms [2]. MS is a heterogeneous disease that affects women two to three times as often as men. While females are at higher risk for MS, males are more likely to display primary progressive disease and accumulate disability faster than female patients in relapse-onset MS [3].

Variations in genes coding for the expression and regulation of immune response may play a role in MS susceptibility and disease progression [4]. The *forkhead box protein 3* (*FOXP3*) gene, a member of transcription factor winged-helix family, is located on chromosome Xp11.23 within the area of autoimmune diseases linkage [5, 6]. The *FOXP3* gene is primarily expressed in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory (Treg) cells [7]. It encodes the FOXP3 protein that is a transcriptional factor for the Treg cell development and function, mainly in the downregulation of cytokine production by T helper (Th)-1 and Th17 effector cells [8].

Treg cells produce the pleotropic cytokine transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) and interleukin (IL)-10, which are dominantly viewed as critical mediators for tolerance and immunosuppression. TGF- $\beta$  is a key regulator of the signaling pathways that initiate and maintain Foxp3 expression and suppressive function in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> precursors. In fact, in a cell type and environment-dependent fashion, Treg and TGF- $\beta$  exert both negative and positive effects on the immune system. TGF- $\beta$  suppresses immune responses through inhibiting the function of inflammatory cells and promoting the function of Treg cells. TGF- $\beta$  suppresses the expression of important genes for T-cell differentiation and function, such as

GATA3, Tbet, signal transducer and activator of transcription 4 (STAT4), interferon (IFN)- $\gamma$ , and granzyme-B. TGF- $\beta$  also regulates the adaptive immunity components, such as T cells, as well as the innate immunity components, such as natural killer (NK) cells [9].

Different single nucleotide variants (SNVs) in the promoter region of *FOXP3*, which can affect the expression of FOXP3 and impair the Treg differentiation and function, have been associated with the susceptibility and prognosis of autoimmune diseases, such as autoimmune thyroid diseases [10], psoriasis [11], systemic sclerosis [12], rheumatoid arthritis [13], and MS [14, 15].

The rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A variant is located on the promoter region and the A allele is correlated with a reduction in FOXP3 expression [16]. Surveys in Iranian population showed an association between the A allele of the variant rs3761548 with MS [14, 15], while in Polish population this association was not demonstrated [17]. In fact, it is well-known that ethnicity influences the presence of variants in various genes, which may cause controversial results in different populations, that is why is important to survey this association in different ethnicities. Thus, the aim of this study was to evaluate the rs3761548 *FOXP3* (-3279 C>A) variant and its association with MS, disability, and disability progression, as well as with TGF- $\beta$ 1 and IL-10 levels in MS patients from Southern Brazilian population.

## **Materials and Methods**

### *Subjects*

The study included 170 MS patients, adults and both sexes, consecutively recruited from the Demyelinating Diseases Outpatient of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, South Brazil. The MS diagnosis was established according to the McDonald criteria [18]. The patients were clinically evaluated for disability using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [19]. Based on their EDSS scores, patients were divided into two groups with

EDSS less or equal to the median value of disability among them (minor disability) and more than this median (moderate/high disability) [20]. Disability progression was evaluated by using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), as proposed elsewhere [21] and score  $\geq 5.0$  denoted higher than the average speed of disability accumulation [22].

As controls, 182 healthy individuals were selected among blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, from the same geographic region of the MS patients. None of the participants in the study presented clinical symptoms or laboratory biomarkers of heart, thyroid, kidney, hepatic, gastrointestinal, or oncologic diseases.

All MS patients were in the remission clinical phase, defined as the period of recovery with no relapse episodes within the last three months prior to the time of enrollment in the study. Demographic, epidemiological and anthropometric data (for 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. 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 [23].

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.

#### *Blood Collection and Immunological Biomarkers*

After fasting for 12 h, venous blood samples were obtained with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), centrifuged at 3000 rpm for 15 min; further, plasma and buffy-coat were separated and divided into aliquots and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. TGF- $\beta 1$  and IL-10 levels were determined using microspheres multiplex immunofluorimetric assay (Novex™, Life Technologies, Frederick, MD, USA) for Luminex platform (MAGPIX™,

Luminex Corp., Austin, TX, USA), that was performed according to the manufacturer's instructions and their reference values.

*Allelic variant rs3761548 (-3279 C>A) of FOXP3*

Genomic DNA was extracted from a buffy-coat of peripheral blood cells using a resin column procedure (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brazil). DNA was used to amplify a 155 base pairs (bp) sequence of the *FOXP3* by polymerase chain reaction (PCR) as previously reported [24] with some modifications. Briefly, the primers used were determined according to the GenBank number NG\_007392.1, 5'-GGCAGAGTTGAAATCCAAGC-3' (forward) and 5'-CAACGTGTGAGAAGGCAGAA-3' (reverse). PCR was performed with a final volume of 25  $\mu$ L, with 0.25mM of each primer, 1.50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.10 mM dNTP, 1.25 units of Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PCR conditions were performed in a thermocycler (Applied Biosystems Veriti™, 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA) and comprised of 4 min denaturation at 94°C for initial denaturation; 35 cycles of 30 sec at 94°C for denaturation, 30 sec at 65°C for the annealing and 30 sec at 72°C for the elongation; and 10 min at 72°C for final elongation. In all PCR analyses, a negative control (without a DNA sample) was included.

The PCR products (155bp) were digested with *Pst*I restriction endonuclease (Anza™, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and analyzed with the restriction fragment length polymorphism (RFLP). The presence of two fragments (80 bp and 75 bp) corresponded to C allele, while the presence of one fragment (155 bp), corresponded to the A allele that did not undergo enzymatic cleavage. All PCR-RFLP products were analyzed on polyacrylamide gel (10%) stained with silver nitrate [24].

### *Statistical Analysis*

Analysis 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 the normality of distribution. TGF- $\beta$ 1 and IL-10 plasma levels were transformed into square root because the data were in right obliquity (as assessed with the Levene test), to ensure data normality. We assessed the differences in continuous variables between groups using the Mann-Whitney test. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as median and interquartile range 25%-75% (IQR). The correlations between TGF- $\beta$ 1 and IL-10 were assessed using Spearman correlation coefficients.

The association between the *rs3761548* (-3279 C>A) of *FOXP3* was analyzed in dominant, codominant, and recessive models according to the sex of the individuals. Multivariate general linear model (GLM) analysis was used to assess the effects of explanatory variables (including diagnosis) on dependent variables (TGF- $\beta$ 1 and IL-10) while controlling for age, sex, ethnicity, BMI, and smoking. The association between TGF- $\beta$ 1 levels and EDSS>3, and the *FOXP3* variant according to sex was evaluated using automatic stepwise binary logistic regression analysis controlled for covariates that may confound the association of interest in three different models. The analysis also included the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) evaluated. All statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 24.

## **Results**

### *Characteristics of the subjects*

**Table 1** shows the baseline data of MS patients and controls. As expected, MS patients did not differ in the variables age (p=0.251), sex (p=0.958), ethnicity (p=0.759), BMI

( $p=0.102$ ), and smoking ( $p=0.326$ ) when compared to controls. The median age at MS diagnosis and disease duration was 32 years (26–43) and 6 years (3–12), respectively. According to the clinical form, 146 patients were classified with relapsing-remitting MS (RRMS) and 24 with progressive MS [5 with primary progressive MS (PPMS) and 19 with secondary progressive MS (SPMS)]. As the median disability in this cohort of patients was 3.0, this value was used as the cut-off to categorize the MS patients for this article, as mild disability ( $EDSS \leq 3$ ) and moderate/high disability ( $EDSS > 3$ ).

Of the 162 patients with EDSS scores, 92 (56.8%) presented moderate/high disability ( $EDSS > 3$ ) and 70 (43.2%) presented mild disability ( $EDSS \leq 3$ ). Eight patients did not have the record of EDSS. Of the 144 MS patients with MSSS scores, 68 (47.2%) showed progression ( $MSSS \geq 5$ ) and 76 (52.8%) showed no progression ( $MSSS < 5$ ). Twenty-six MS patients did not have the record of MSSS. According to the MS therapy, 16 (9.5%) patients were without treatment, 97 (57.7%) were treated with interferon  $\beta$ , 42 (25.0%) were treated with glatiramer acetate, 12 (7.2%) were using natalizumab and one (0.6%) was using fingolimod. Two patients did not have the therapy recorded.

MS patients showed higher levels of TGF- $\beta$ 1 than controls, with median of 3015.3 pg/mL (IQR: 1441.9-4675.6) *versus* 725.0 pg/mL (IQR: 324.5-1555.7),  $p < 0.001$ ; moreover, they showed higher IL-10, with median of 5.283 pg/mL (IQR: 1.569-16.950) *versus* 0.010 pg/mL (IQR: 0.010-0.957),  $p < 0.001$ , than controls (**Figure 1**). It should be stressed that all these biomarker results were not adjusted for possible extraneous variables including age, sex, BMI, ethnicity, and smoking.

#### *Associations with MS diagnosis*

**Table 2** shows the results of a multivariate GLM analysis with TGF- $\beta$ 1 and IL-10 as dependent variables and MS diagnosis as the explanatory variable while adjusting for age, sex, BMI, ethnicity, and smoking. We found that MS diagnosis, age and smoking had

significant effects on the TGF- $\beta$ 1 and IL-10 levels, whereas sex, BMI, and ethnicity did not. Tests for between-subject effects showed that MS diagnosis was positively associated with TGF- $\beta$ 1 and IL-10, with a strong effect size of 40.3% and 32.5%, respectively. Smoking and age showed a modest effect on IL-10 levels. The GLM model showed the equivalence of covariance matrices ( $P=0.100$ ) and the dependent variables presented equal variances ( $P>0.05$ ).

*rs3761548 FOXP3 -3279 C>A genotypes*

The Hardy–Weinberg equilibrium of rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A observed in the MS patients and controls was analyzed only in the females because of males carry only one copy of the X-chromosome; the genotype and allele frequencies were consistent with those expected ( $p>0.05$ ) in both groups (female patients and controls).

**Table 3** shows the rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A allelic and genotype frequency in different genetic models, according to the sex of the individuals. In all genetic models tested, we observed an association between this genetic variant and MS susceptibility in female individuals. Among females, the allele model showed that the presence of A allele was associated with MS (OR: 2.23; 95% CI: 1.54-3.22,  $p<0.001$ ).

In a codominant model, the results demonstrated that the frequency of the CC, CA and AA genotypes in females differed between patients with MS and controls (25.6%, 53.7% and 20.7% *versus* 46.9%, 48.5%, and 4.6%, respectively,  $p<0.001$ ). The CA and AA genotypes were associated with MS (OR: 2.03, 95% CI: 1.66-3.53,  $p=0.012$ ; OR: 8.19, 95%CI: 3.04-22.07,  $p<0.001$ , respectively). With the dominant model, the CA+AA genotypes were also associated with MS (74.4% *versus* 53.1%) with OR of 2.57 (95% CI: 1.50-4.37,  $p<0.001$ ). Furthermore, in the recessive model, the AA genotype was also associated with MS (20.7% *versus* 4.6%) with OR of 5.38 (95% CI: 2.12-13.64,  $p<0.001$ ). After adjustment by age, ethnicity, BMI and smoking, all these results remained significant. On the other hand, we

have also observed that the frequency of A allele of the rs3761548 did not differ in male patients with MS in comparison to male controls (56.7% *versus* 46.2%, OR 0.72 and 95% CI 0.30- 1.69,  $p=0.338$ ).

In **Table 4**, we evaluated whether the genotyping, using the dominant model (CC *versus* CA+AA) could interfere in disability, disability progression, and clinical forms of MS in both female and male MS patients. Female MS patients carrying the CA+AA genotypes were older and had a higher frequency of moderate/high disability (EDSS >3,  $p=0.047$ ) than those carrying the CC genotype. However, there was no association between the genotypes and ethnicity ( $p=0.636$ ), BMI ( $p=0.859$ ), smoking ( $p=0.165$ ), IL-10 levels ( $p=0.785$ ), age of diagnosis ( $p=0.086$ ), disability progression ( $p=0.354$ ), MS clinical forms ( $p=0.262$ ), and MS treatment ( $p=0.074$ ). In male MS patients, no association was observed between genotype frequency and age ( $p=0.329$ ), ethnicity ( $p=0.880$ ), BMI ( $p=0.553$ ), smoking ( $p=0.565$ ), IL-10 levels ( $p=0.950$ ), age of diagnosis ( $p=0.152$ ), disability ( $p=0.716$ ), disability progression ( $p=0.611$ ), MS clinical forms ( $p=0.460$ ), and MS treatment ( $p=0.254$ ).

**Figure 2** shows the plasma levels of TGF- $\beta$ 1 according to rs3761548 *FOXP3* genotypes and alleles and the sex of MS patients. In a codominant model, female MS patients carrying the AA and CA genotypes showed higher TGF- $\beta$ 1 levels than those carrying the CC genotype [median 2137.3 pg/mL (IQR: 808.8-4251.2) for CC genotype; median 3509.0 pg/mL (IQR: 2043.74-4694.28) for CA genotype, and median 3872.0 pg/mL (IQR: 1589.7-5175.5), for AA genotype,  $p=0.043$ ]. With the dominant model, female MS patients carrying the CA+AA genotypes showed higher TGF- $\beta$ 1 levels than those carrying the CC genotype [median 3524.4 pg/mL (IQR: 2003.9-4793.9) *versus* median 2137.2 pg/mL (IQR: 808.7-4251.2),  $p=0.019$ ]. However, in the recessive model, female MS patients with AA genotype showed no difference in the TGF- $\beta$ 1 levels compared to those with CC+CA genotypes [median 3873.0 pg/mL (IQR: 1589.7-5175.5) *versus* median 3142.8 pg/mL (IQR: 1435.19-

4581.0),  $p=0.329$ ]. TGF- $\beta$ 1 did not differ in male MS patients according to allele frequency, with median 3254.3 pg/mL (IQR: 2032.6-4955.3) among those with C allele *versus* median 1759.2 pg/mL (IQR: 1326.3-3785.6) among those with the A allele ( $p=0.080$ ).

In order to delineate whether TGF- $\beta$ 1 levels and moderate/high disability (EDSS  $>3$ ) were independently associated with the dominant model (CC *versus* CA+AA) of rs3761548 *FOXP3* variant in female MS patients, we carried out three different automatic stepwise regression analyses models with TGF- $\beta$ 1 levels, disability, age, BMI, smoking, age on diagnosis, and MS treatment as dependent variables.

**Table 5**, regression #1 shows that TGF- $\beta$ 1 levels (OR: 1.026, 95% CI: 1.001-1.053,  $p=0.045$ ) and moderate/high disability (EDSS  $>3$ ) (OR: 2.678; 95% CI: 1.026-6.995,  $p=0.044$ ) were positively associated with the CA+AA genotypes. Entering age, ethnicity, smoking, and age of diagnosis in the model #2, TGF- $\beta$  levels and moderate/high disability remained associated with the CA+AA genotypes (OR: 1.027, 95% CI: 1.000-1.055,  $p=0.050$ ; OR: 2.842, 95% CI: 1.042-7.750,  $p=0.041$ ), respectively. After entering the MS treatment in the model #3, TGF- $\beta$ 1 levels remained positively associated with the CA+AA genotypes in female MS patients (OR: 1.027, 95%CI: 1.001-1.054,  $p=0.043$ ); however, the moderate/high disability was no longer significantly associated with the presence of CA+AA genotypes (OR:0.480; 95% CI: 0.159-1.450,  $p=0.193$ ).

## Discussion

The main finding of the present study is that, in all the genetic models, the rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A variant was associated with MS diagnosis in female patients. In the allele, codominant, dominant, as well as recessive models, the presence of A allele in heterozygosity or in homozygosity increased the chance to have the MS diagnosis. Other important result is that IL-10 and TGF- $\beta$ 1 plasma levels were higher in MS patients than controls, as well as female MS patients carrying the A allele in heterozygosity or homozygosity (CA+AA

genotypes) showed higher levels of TGF- $\beta$ 1 than those female MS patients carrying the C allele in homozygosity (CC genotype). The presence of MS diagnosis was the explanatory variable that exerted the strongest effect in both TGF- $\beta$ 1 and IL-10 plasma levels (40.3% and 32.5%, respectively).

The higher IL-10 levels observed among the MS patients than controls are consistent with previous studies and underscored the role of IL-10 as anti-inflammatory cytokine produced by macrophages M2 and other cells to modulate the inflammatory autoimmune responses [9]. Huss et al (2010) reported that IL-10 was being induced in a dose-dependent manner in Th1 cells by TGF- $\beta$  and that this IL-10 expression in effector Th cells diminished the encephalitogenic capacity of myelin-specific Th1 cells [25]. Further, Huss et al (2011) observed that the percentage of myelin-specific Th1 cells expressing IL-10, as well as the amount of IL-10, increased with each cycle of antigen activation, and that TGF- $\beta$ 1 induces IL-10 by the Th1 via Smad4 [26]. They also concluded that the encephalitogenicity could be restored by inhibiting IL-10. However, contradictory results are also reported [27]. According to these authors, MS patients have defects in peripheral immune regulation, including higher expression of costimulatory molecules on antigen presenting cells (APCs), lower cytotoxic T lymphocyte antigen (CTLA)-4 levels, and lower IL-10 production [27].

The high levels of TGF- $\beta$ 1 observed in the present study are also in agreement with other studies carried out in MS patients [28–30], even in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients during remissions [31] and in the stable phase of MS [32]. Both RRMS and progressive SPMS patients have more elevated blood levels of TGF- $\beta$ 1 compared with either healthy controls or patients with other neurological diseases, such as amyotrophic lateral sclerosis, multisystemic atrophy and lumbar discopathy [33]. However, other studies have contradicted these findings by reporting decreased TGF- $\beta$ 1 production in cultured peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with MS compared to healthy controls [34]

and that T cell clones isolated from patients with MS during exacerbation were less likely to produce TGF- $\beta$ 1 upon proteolipid protein stimulation than those obtained during remission [35].

One study showed the disturbed cytokine levels in RRMS patients categorized as mild disability (EDSS 1.0-2.0) and moderate disability (EDSS 2.5-4.0) compared to controls. While IL-4 was increased in both RRMS patient groups, IL-10 were slightly increased in patients with minor neurological disability; however, TGF- $\beta$ 1 levels were decreased in both groups of RRMS patients compared to controls as well as did not differ between the both groups of RRMS patients [20].

Actually, TGF- $\beta$ 1 can have multifunctional roles and the net effect outcome appears to depend on the location, timing, and the nature of the cell that is targeted. In this respect, TGF- $\beta$ 1 has differential effects on virtually every cell type in the CNS [36–38]. It is also well established that in the presence of IL-6, TGF- $\beta$ 1 is critical for the induction of Th17 cells, while in the absence of IL-6, Tregs can be induced [39]. Some studies have demonstrated TGF- $\beta$ 1 as a strong immunoregulatory cytokine on antigen presenting cells (APCs) both *in vitro* and *in vivo* [40]. These effects can be attributed to different major pathways including the control of IL-12 production by monocyte-derivate dendritic cells (moDCs) by the blockage of IL-12-induced tyrosine phosphorylation inhibiting the Jak-Stat pathway and differentiation of Th1 cell; subsequent inhibition of IFN- $\gamma$  production by Th1 cells and the reactive oxygen species (ROS) production by moDCs [40]. Moreover, TGF- $\beta$ 1, which is up-regulated in the remission phase of MS, induces microglia to secrete hepatocyte growth factor (HGF) to promote oligodendrocyte precursor cells (OPC) chemotaxis; with this effect, may play pivotal role in myelin repair [37]. Yang et al (2009) suggested that TGF- $\beta$ 1 negatively regulated the differentiation of encephalitogenic Th17 cells but that this can be overcome when myelin-specific T cells are reactivated in the absence of TGF- $\beta$ 1 [41]. TGF- $\beta$ 1 has also

been shown to play a role in the differentiation of Th9 cells which produce robust amounts of IL-9 [42], a cytokine that negatively regulated Th17 cells.

Taken together, these data may suggest that enhancement of TGF- $\beta$ 1 signaling in T cells of MS patients may be beneficial. Although TGF- $\beta$ 1 has been implicated in some potentially inflammatory T cell populations, such as Th9 and Th17 cells, the data is not compelling in human CD4 T cells. In contrast, there is a consensus that TGF- $\beta$ 1 enhances Treg development and function, and negatively regulates encephalitogenic Th1 cells [43]. Therefore, we hypothesized that the increased TGF- $\beta$ 1 and IL-10 plasma levels observed among the MS patients in the present study, probably, could represent an endogenous anti-inflammatory response aimed at counteracting ongoing immunoinflammatory events in the MS.

The association between rs3761548 *FOXP3* variant with MS susceptibility among female patients in the present study in three genetic models, suggest a functional defect on Treg in patients with the AA and CA genotypes. The functional consequence of this variant in the promoter region of *FOXP3* is the loss of binding of some transcription factors, such as E47 and C-Myb, leading to defective transcription of *FOXP3* [16], and therefore, might affect the function or quantity of Tregs [44]. Similarly with our results, other authors found an association between rs3761548 *FOXP3* variant and MS in population of Iran [14, 15]. The frequencies of AA and CA genotypes were also higher in MS group as compared with healthy subjects [14]. On the other hand, other study failed to demonstrate this association [17].

The rs3761548 *FOXP3* genotypes have been associated with the function of Tregs in different conditions. While CC genotype was associated with the normal suppressor role of Tregs [45], the AA genotype was associated with impaired immune tolerance [46, 47]. Individuals with the rs3761548 *FOXP3* CC genotype showed better graft survival in kidney transplantation than those with the CA or AA genotype [45]. On the other hand, patients with

the AA genotype showed a weaker Treg function and were more prone to allograft rejection in kidney transplantation than those with the CC genotype [46]. In addition, an association between the rs3761548 AA genotype and lower graft survival have been reported in Indian individuals [47].

Moreover, the rs3761548 *FOXP3* AA genotype has been associated with other autoimmune diseases, including psoriasis in Chinese individuals [11], and intractability of Graves' disease in Japanese individuals [10].

The high levels of TGF- $\beta$ 1 observed among the female MS patients carrying the CA+AA genotypes in the present study may be explained, in part, by the fact of many other cell types, such as macrophages M2, leukocytes and stromal cells, are able to generate TGF- $\beta$ 1 [9]. Considering that TGF- $\beta$ 1 is able to convert CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> non-Treg cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells, and this conversion was accompanied with increased Foxp3 expression [48, 49], one possible hypothesis is that the high levels of TGF- $\beta$ 1 observed in patients with the CA+AA genotypes, could be produced by other cells than Treg in an attempt to restore the number and function of Treg cells that may be decreased in these patients.

The inconsistent results observed on reported studies may be explained by the different autoimmune diseases included at that studies, the genetic heterogeneity presented by the genotyped individuals, the genotyping methods (RFPL *versus* non-RFLP), the assay for the cytokine measurement, the sample size and the control population (hospital-based controls *versus* community-based controls) [50].

Limitations of this study should be considered. Firstly, this is a case-control design, which does not allow inferences on causal relationship. In addition, the relatively small number of subjects, a single basal TGF- $\beta$ 1 and IL-10 measurement and a specific genetic variant analysis, which precludes the assessment of how other factors may impact on the complex relationship between *FOXP3* genotype, cytokine levels and MS. However, the

statistical analysis with adjusting for many confounding variables including age, sex, ethnicity and smoking is one of its strengths. To our knowledge, this is the first study to investigate the relationship between rs3761547 *FOXP3* -3279 C>A variant in MS patients from Brazilian population.

Taken together, our results demonstrated that rs3761548 *FOXP3* CA+AA genotypes were associated with MS diagnosis and higher levels of TGF- $\beta$ 1 among female MS patients than those with the CC genotype. However, the presence of the A allele was not associated with moderate/high disability as well as disability progression. These data suggest that the A allele of *FOXP3* -3279 C>A variant may be associated with the quantitative or functional alteration of Treg cells, which could be one of the factors involved in susceptibility to MS in females. The complex interaction between *FOXP3* genetic variants, TGF- $\beta$ 1 levels and MS deserves further investigation.

### **Compliance with ethical standards**

#### *Conflict of interest*

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### *Ethical approval*

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.

### **Financial support**

The study was supported by grants from 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).

### **Author's contributions**

**Conception and research design:** Edna Maria Vissoci Reiche and Andrea Name Colado Simão; **Manuscript writing and discussion of results:** Edna Maria Vissoci Reiche, Andrea Name Colado Simão; Tamires Flauzino; Data collection: Damacio Ramón Kaimen-Maciel, Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira, Tamires Flauzino, Daniela Frizon Alfieri, Ana Paula Kallaur, and Sayonara Rangel Oliveira, which contributed equally; **Laboratory analysis:** Tamires Flauzino, Daniela Frizon Alfieri, Marcell Alysson Batisti Lozovoy, Karen Brajão de Oliveira; **Statistical analysis:** Andrea Name Colado Simão, Daniela Frizon Alfieri. All authors have read and approved the final manuscript.

### **References**

1. Sospedra M, Martin R (2016) Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 36:115–127. doi: 10.1055/s-0036-1579739
2. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L (2016) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 13:26–36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187
3. Ribbons KA, McElduff P, Boz C, et al (2015) Male sex is independently associated with faster disability accumulation in relapse-onset MS but not in primary progressive MS. *PLoS One* 10:1–11 . doi: 10.1371/journal.pone.0122686
4. Kallaur AP, Kaimen-Maciel DR, Morimoto HK, et al (2011) Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis (review). *Int J Mol Med* 28:467–79 . doi: 10.3892/ijmm.2011.731
5. Pereira LMS, Gomes STM, Ishak R, Vallinoto ACR (2017) Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. *Front Immunol* 8:1–24 . doi: 10.3389/fimmu.2017.00605

6. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, et al (2011) Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanita* 52:205–12 . doi: 10.4415/ANN\_16\_02\_12
7. Walker MR, Kasprowicz DJ, Gersuk VH, et al (2003) Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. *J Clin Invest* 112:1437–1443. doi: 10.1172/JCI200319441
8. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330–336. doi: 10.1038/ni904
9. Wan YY, Flavell RA (2007) ‘Yin-Yang’ functions of TGF- $\beta$  and Tregs in immune regulation. *Immunol Rev* 220:199–213. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00565.x
10. Inoue N, Watanabe M, Morita M, et al (2010) Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 162:402–406. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04229.x
11. Gao L, Li K, Li F, et al (2010) Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *J Dermatol Sci* 57:51–56. doi: 10.1016/j.jdermsci.2009.09.010
12. D’Amico F, Skarmoutsou E, Marchini M, et al (2013) Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett* 152:109–113. doi: 10.1016/j.imlet.2013.05.006
13. Hashemi V, Farrokhi AS, Tanomand A, et al (2018) Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. *Immunol Lett* 204:16–22. doi: 10.1016/j.imlet.2018.10.001
14. Jafarzadeh A, Jamali M, Mahdavi R, et al (2015) Circulating Levels of Interleukin-35 in Patients with Multiple Sclerosis: Evaluation of the Influences of FOXP3 Gene Polymorphism and Treatment Program. *J Mol Neurosci* 55:891–897. doi: 10.1007/s12031-014-0443-z
15. Eftekharian MM, Sayad A, Omrani MD, et al (2016) Single nucleotide polymorphisms in the FOXP3 gene are associated with increased risk of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Antibodies* 24:85–90. doi: 10.3233/HAB-160299

16. Shen Z, Chen L, Hao F, et al (2010) Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J Cell Mol Med* 14:226–241. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00370.x
17. Wawrusiewicz-Kurylonek N, Chorąży M, Posmyk R, et al (2018) The FOXP3 rs3761547 Gene Polymorphism in Multiple Sclerosis as a Male-Specific Risk Factor. *NeuroMolecular Med* 20:537–543. doi: 10.1007/s12017-018-8512-z
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366
19. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–52
20. Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, et al (2011) Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 300:135–141. doi: 10.1016/j.jns.2010.08.053
21. Roxburgh RHSR, Seaman SR, Masterman T, et al (2005) Multiple sclerosis severity score: Using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64:1144–1151. doi: 10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8
22. Koch MW, George S, Wall W, et al (2015) Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 350:46–50. doi: 10.1016/j.jns.2015.02.009
23. BRAZIL. IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the population and households: results of the universe. [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
24. Banin Hirata BK, Losi Guembarovski R, Vitiello GAF, et al (2017) FOXP3 Allelic Variants and Haplotype Structures Are Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. *Dis Markers* 2017:1–8 . doi: 10.1155/2017/6359603
25. Huss DJ, Winger RC, Peng H, et al (2010) TGF-beta Enhances Effector Th1 Cell Activation but Promotes Self-Regulation via IL-10. *J Immunol* 184:5628–5636. doi: 10.4049/jimmunol.1000288

26. Huss DJ, Winger RC, Cox GM, et al (2011) TGF- $\beta$  signaling via Smad4 drives IL-10 production in effector Th1 cells and reduces T-cell trafficking in EAE. *Eur J Immunol* 41:2987–2996. doi: 10.1002/eji.201141666
27. Nylander A, Hafler DA (2012) Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122:1180–1188. doi: 10.1172/JCI58649
28. Monteyne P, Guillaume B, Sindic CJ (1998) B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), interleukin-12 and transforming growth factor-beta mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 91:198–203
29. Link J, Söderström M, Olsson T, et al (1994) Increased transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-4, and interferon- $\gamma$  in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36:379–386. doi: 10.1002/ana.410360309
30. Hassanzadeh G, Hosseini Quchani S, Sahraian MA, et al (2016) Leukocyte Gene Expression and Plasma Concentration in Multiple Sclerosis: Alteration of Transforming Growth Factor- $\beta$ s, Claudin-11, and Matrix Metalloproteinase-2. *Cell Mol Neurobiol* 36:865–872. doi: 10.1007/s10571-015-0270-y
31. Carrieri PB, Provitera V, Bruno R, et al (1997) Possible role of transforming growth factor-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurol Res* 19:599–600
32. Carrieri PB, Provitera V, Rosa T De, et al (1998) Profile of Cerebrospinal Fluid and Serum Cytokines in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. A Correlation with Clinical Activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:373–382. doi: 10.3109/08923979809034820
33. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, et al (1998) Blood levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon-beta 1b (IFN-beta1b). *Clin Exp Immunol* 113:96–9
34. Mokhtarian F, Shi Y, Shirazian D, et al (1994) Defective production of anti-inflammatory cytokine, TGF-beta by T cell lines of patients with active multiple sclerosis. *J Immunol* 152:6003–10

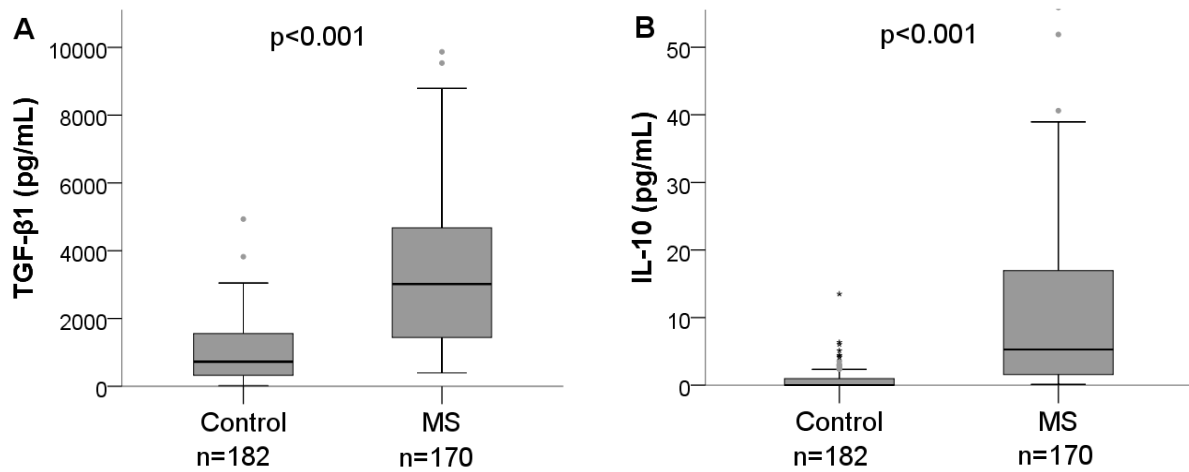
35. Correale J, Gilmore W, McMillan M, et al (1995) Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol* 154:2959–68
36. Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L (1997) Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol* 77:45–50
37. Lalive P, Paglinawan R, Biollaz G, et al (2005) TGF-beta-treated microglia induce oligodendrocyte precursor cell chemotaxis through the HGF-c-Met pathway. *Eur J Immunol* 35:727–737. doi: 10.1002/eji.200425430
38. He Y, Zhang H, Yung A, et al (2014) ALK5-dependent TGF- $\beta$  signaling is a major determinant of late-stage adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 17:943–952. doi: 10.1038/nn.3732
39. Fu S, Zhang N, Yopp AC, et al (2004) TGF-beta Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 - Precursors. *Am J Transplant* 4:1614–1627. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00566.x
40. Parsa R, Lund H, Tosevski I, et al (2016) TGF $\beta$  regulates persistent neuroinflammation by controlling Th1 polarization and ROS production via monocyte-derived dendritic cells. *Glia* 64:1925–1937. doi: 10.1002/glia.23033
41. Yang Y, Weiner J, Liu Y, et al (2009) T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 206:1549–1564. doi: 10.1084/JEM.20082584
42. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al (2008) IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3+ T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9+ IL-10+ Foxp3- effector T cells. *Nat Immunol* 9:1347–1355. doi: 10.1038/ni.1677
43. Lee PW, Severin ME, Lovett-Racke AE (2017) TGF- $\beta$  regulation of T cells in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 47:446–453. doi: 10.1002/eji.201646716
44. Hoogendoorn B, Coleman SL, Guy CA, et al (2003) Functional analysis of human promoter polymorphisms. *Hum Mol Genet* 12:2249–2254. doi: 10.1093/hmg/ddg246
45. Park H, Lee N, In JW, et al (2017) Association of Foxp3 Polymorphism With Allograft Outcome in Kidney Transplantation. *Ann Lab Med* 37:420–425. doi: 10.3343/alm.2017.37.5.420

46. QIU X-Y, JIAO Z, ZHANG M, et al (2012) Genetic association of FOXP3 gene polymorphisms with allograft rejection in renal transplant patients. *Nephrology* 17:423–430. doi: 10.1111/j.1440-1797.2012.01561.x
47. Misra MK, Mishra A, Pandey SK, et al (2016) Association of functional genetic variants of transcription factor Forkhead Box P3 and Nuclear Factor- $\kappa$ B with end-stage renal disease and renal allograft outcome. *Gene* 581:57–65. doi: 10.1016/j.gene.2016.01.028
48. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al (2004) Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 172:5149–53
49. Rich S, Seelig M, Lee HM, Lin J (1995) Transforming growth factor beta 1 costimulated growth and regulatory function of staphylococcal enterotoxin B-responsive CD8+ T cells. *J Immunol* 155:609–18
50. He Y, Na H, Li Y, et al (2013) FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. *Hum Immunol* 74:1665–1671. doi: 10.1016/j.humimm.2013.08.270

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

	Control (n=182)	MS (n=170)	p value
Age (year)	40 (31 – 47)	39 (31 – 51)	0.251
Sex (Female/Male)	130 (71.4)/52(28.6)	121 (71.2)/49 (28.8)	0.958
Ethnicity			
Caucasian/Non-Caucasian	141 (77.5)/41 (22.5)	134 (78.8)/36(21.2)	0.759
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	25.41 (22.64 – 29.03)	24.40 (21.80 – 28.70)	0.102
Smoking (No/Yes)	164(90.1) /18 (9.9)	144/22	0.326
Age at diagnosis (year)	-	32 (26-43)	
Duration of illness (year)	-	6 (3-12)	
Clinical forms			
Relapsing-remitting MS	-	146 (85.9)	
Secondary Progressive MS	-	19 (11.2)	
Primary Progressive MS	-	5 (2.9)	
EDSS Range (Median, IQR)*	-	0.0-9.0 (3.0, 1.0-4.5)	
EDSS >3	-	92 (56.8)	
EDSS ≤3	-	70 (43.2)	
MSSS Range (Median, IQR)**		0.09-9.92 (4.63, 1.62-7.65)	
MSSS ≥5	-	68 (47.2)	
MSSS <5	-	76 (52.8)	
MS Treatment ***			
Without treatment	-	16 (9.5)	
Interferon β	-	97 (57.7)	
Glatiramer acetate	-	42 (25.0)	
Natalizumab	-	12 (7.2)	
Fingolimod	-	1 (0.6)	

All results of Mann Whitney test.  $X^2$ : results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). EDSS: Expanded Disability Status Scale; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score; \*: Eight patients did have the record of EDSS. \*\*: Twenty-six MS patients did have the record of MSSS. \*\*\*: Two patients did not have the MS treatment record.



**Figure 1.** Plasma levels of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) and interleukin 10 (IL-10) in patients with multiple sclerosis (MS) and controls. A) Increased TGF-β1 levels in MS patients compared to controls ( $p < 0.001$ ); B) Increased IL-10 levels in MS patients compared to controls ( $p < 0.001$ ); results of Mann Whitney test expressed as median and interquartile range (25%-75%).

**Table 2** Results of multivariate GLM analysis with transforming growing factor beta (TGF- $\beta$ ) and interleukin 10 (IL-10) as dependent variables and multiple sclerosis as independent variable

<b>Model</b>	<b>Dependent variable</b>	<b>Independent variable</b>	<b>F</b>	<b>df</b>	<b>p</b>	<b>Partial eta square</b>
Multivariable	TGF- $\beta$ 1	MS	112.20	2/192	< <b>0.001</b>	0.549
		IL-10				
		Age	3.77	2/192	<b>0.025</b>	0.039
		Sex	1.24	2/192	0.292	0.013
		Ethnicity	0.39	2/192	0.674	0.004
		BMI	1.12	2/192	0.329	0.012
		Smoking	4.27	2/192	<b>0.015</b>	0.044
Univariate	TGF- $\beta$ 1	MS (+)	124.72	1/191	< <b>0.001</b>	0.403
	IL-10	MS (+)	88.87	1/191	< <b>0.001</b>	0.325
		Age (-)	6.20	1/191	<b>0.014</b>	0.032
		Non-smoking (+)	8.52	1/191	<b>0.004</b>	0.044

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; MS: multiple sclerosis; BMI: body mass index; TGF- $\beta$ 1: transforming growing factor beta 1; IL-10 interleukin 10.

**Table 3** Distribution of rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A genotypes and allelic frequencies among Brazilian patients with multiple sclerosis (MS) and controls according to their sex

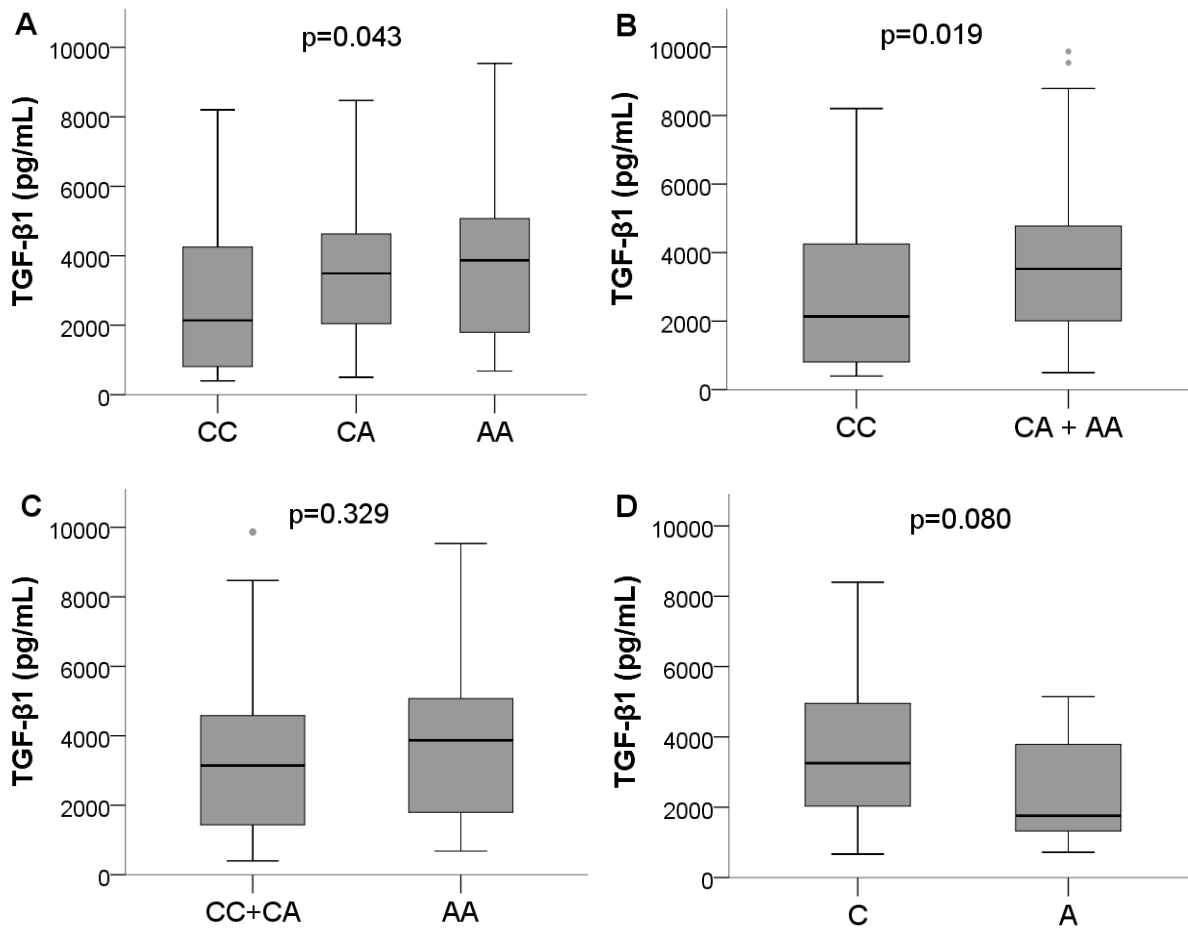
Sex		Controls (n=182)	MS patients (n=170)	OR (95% CI)	<i>p</i> value	Adjusted OR (95% CI)*	Adjusted <i>p</i> value*
<b>Female</b>	Allele model						
	C	185 (71.5)	127 (52.5)	Reference	<b>&lt;0.001</b>	Reference	<b>&lt;0.001</b>
	A	75 (28.8)	115 (47.5)	2.23 (1.54-3.22)		2.21 (1.51-3.24)	
	Co-dominant						
	CC	61 (46.9)	31 (25.6)	Reference	-	Reference	-
	CA	63 (48.5)	65 (53.7)	2.03 (1.66-3.53)	<b>0.012</b>	2.04 (1.14-3.63)	<b>0.015</b>
	AA	6 (4.6)	25 (20.7)	8.19 (3.04-22.07)	<b>&lt;0.001</b>	9.38 (3.19-27.59)	<b>&lt;0.001</b>
	Dominant model						
	CC	61 (46.9)	31 (25.6)	Reference	<b>&lt;0.001</b>	Reference	<b>0.001</b>
	CA+AA	69 (53.1)	90 (74.4)	2.57 (1.50-4.37)		2.56 (1.46-2.47)	
Recessive model							
CC+CA	124 (95.4)	96 (79.3)	Reference	<b>&lt;0.001</b>	Reference	<b>0.001</b>	
AA	6 (4.6)	25 (20.7)	5.38 (2.12-13.64)		6.01 (2.18-16.56)		
<b>Male</b>	Allele model						
	C	28 (53.8)	31 (63.3)	Reference	0.338	Reference	0.567
	A	24 (46.2)	18 (56.7)	1.45 (0.66-3.27)		0.72 (0.30-1.69)	

\* Adjusted by age, ethnicity, body mass index, and smoking.

**Table 4** Demographic and clinical data in relation to rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A dominant model for multiple sclerosis (MS) according to sex of the patients

	Female		p value	Male		p value
	CC (n=31)	CA+AA (n=80)		C (n=31)	A (n=18)	
Age (year)	35.0 (28.0-47.0)	44.5 (31.0-54.0)	<b>0.043</b>	36.0 (31.0-51.0)	37.0 (29.0-44.0)	0.329
Ethnicity (C/NC)	26 (83.9)/ 5 (16.1)	72 (80.0)/ 18 (20.0)	0.636	23 (74.2)/ 8 (25.8)	13 (72.2)/ 5 (27.8)	0.880
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.7 (20.3-29.7)	24.20(21.3-28.4)	0.859	25.4 (22.3-28.6)	26.2 (24.1-30.2)	0.553
Smoking (Yes)	6 (20.0)	9 (10.2)	0.165	4 (12.9)	3 (17.6)	0.565
IL-10 (pg/mL)	4.330 (1.844-12.342)	5.709 (1.328-16.224)	0.785	3.609 (1.904-26.788)	6.165 (1.316-28.050)	0.950
Age of diagnosis (year)	30.0 (24.0-37.0)	35.0 (26.0-43.0)	0.086	32.0 (23.0-41.0)	37.0 (29.0-44.0)	0.152
EDSS >3*	9 (33.3)	48 (55.2)	<b>0.047</b>	14 (46.7)	7 (41.2)	0.716
MSSS ≥5**	10 (40.0)	39 (50.6)	0.354	13 (48.1)	6 (40.0)	0.611
RRMS	26 (83.9)	82 (91.1)	0.262	23 (74.2)	15 (83.3)	0.460
Progressive MS	5 (16.1)	8 (8.9)		8 (25.8)	3 (16.7)	
MS Treatment***						
Without treatment	6 (19.4)	6 (6.8)	0.074	4 (12.9)	0 (0.0)	0.254
Interferon β	11 (35.5)	53 (60.2)		22 (71.0)	11 (64.0)	
Glatiramer	11 (35.5)	24 (27.3)		3 (9.7)	4 (23.5)	
Natalizumab	3 (9.7)	5 (5.7)		2 (6.5)	2 (11.8)	

Results of Mann Whitney test.  $X^2$ : results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as median and interquartile range (25%-75%) and categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%). BMI: body mass index; EDSS: Expanded Disability Status Scale; MSSS: Multiple Sclerosis Severity Score. RRMS: Relapsing-remitting multiple sclerosis. \*: Eight patients did have the record of EDSS; \*\*: Twenty-six MS patients did have the record of MSSS; \*\*\*: Two patients did have the therapy recorded



**Figure 2.** Plasma levels of transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) according to rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A variant models and sex in multiple sclerosis (MS) patients. In female patients, TGF-β1 plasma levels were associated with MS according to: A: codominant model (CC vs. CA vs. AA, p=0.043); B: dominant model (CC vs. CA+AA, p=0.019); C: recessive model (CC+CA vs. AA, p=0.329). D: In male patients, TGF-β1 levels did not differ according to allele model (C vs. A, p=0.080).

**Table 5** Result of binary logistic regression analysis with the dominant model of *FOXP3* genetic variant in females MS patients as dependent variables

Sex	Model	Variable	Wald	df	P value	OR (CI 95%)
Female	#1	TGF- $\beta$ 1*	4.009	1	<b>0.045</b>	1.026 (1.001-1.053)
		EDSS >3	4.046	1	<b>0.044</b>	2.678 (1.026-6.995)
	#2	TGF- $\beta$ 1*	3.838	1	<b>0.050</b>	1.027 (1.000-1.055)
		EDSS >3	4.162	1	<b>0.041</b>	2.842 (1.042-7.750)
		Smoking	3.066	1	0.080	3.244 (0.869-12.109)
	#3	TGF- $\beta$ 1*	4.107	1	<b>0.043</b>	1.027 (1.001-1.054)
		EDSS >3	1.692	1	0.193	0.480 (0.159-1.450)
		Age	3.548	1	0.060	1.35 (0.999-1.073)

MS: multiple sclerosis; TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor  $\beta$ 1; \*TGF- $\beta$ 1 plasma levels were transformed into square root because the data were in right obliquity; EDSS: Expanded Disability Status Scale; Models: #1: TGF- $\beta$ 1 + EDSS; #2: TGF- $\beta$ 1 + EDSS + age + ethnicity + smoking + age of diagnosis; #3: TGF- $\beta$ 1 + EDSS + age + ethnicity + smoking + age of diagnosis + MS treatment

## 6 CONCLUSÕES

- Dentre as características demográficas, antropométricas, epidemiológicas, clínicas e os biomarcadores IM&NO avaliados, os melhores parâmetros que foram associados ao aumento da incapacidade foram a idade, o escore da resposta Th17/Treg, escore LDL/HDL, os níveis de homocisteína e as proteínas carbonílicas (todos positivamente);
- O conjunto de biomarcadores formado pela relação entre Th17/Treg, juntamente com a idade e níveis aumentados de proteína carbonílica, foram os biomarcadores mais importantes para predizer a incapacidade dos pacientes com EM, seguido pelos valores de homocisteína e do escore LDL/HDL;
- Os pacientes com EM apresentaram níveis mais altos de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 quando comparados aos controles e, após ajuste com as variáveis confundidoras (idade, sexo, IMC, etnia e tabagismo), o diagnóstico de EM foi positivamente associado com os níveis de TGF- $\beta$ 1 e IL-10 e exerceu um efeito em seus níveis de 40,3% e 32,5%, respectivamente;
- A variante rs3761548 do *FOXP3* -3279 C>A foi associada com a EM, no sexo feminino, em todos os modelos genéticos avaliados (alélico, co-dominante, dominante e recessivo). A frequência dos genótipos CC, CA e AA nas pacientes com EM foi de 25,6%, 53,7% e 20,7%, respectivamente, e de 46,9%, 48,5% e 4,6% para CC, CA e AA, respectivamente, no grupo controle;
- Em mulheres com EM, a presença do alelo A (CA+AA) foi associada com maiores níveis de TGF- $\beta$ 1 após ajuste pelas variáveis confundidoras (idade, etnia, tabagismo, idade de diagnóstico e tratamento);
- A incapacidade e a progressão da incapacidade não foram associadas com a variante genética rs3761548 *FOXP3* -3279 C>A após ajuste das variáveis confundidoras.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo possui uma análise estatística robusta e o ajuste dos resultados para muitas variáveis confundidoras, incluindo idade, sexo, etnia, tabagismo e terapia para EM. Além disso, este é o primeiro estudo a investigar a relação entre a variante rs3761547 *FOXP3* -3279 C>A em pacientes com EM da população brasileira. O melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da EM pode identificar biomarcadores que pode explicar, em parte, a sua heterogeneidade clínica, como também, apontar para possíveis estratégias terapêuticas que possam ser utilizadas em associação com os atuais medicamentos no tratamento de pacientes com EM, em especial, aos que não respondem a estes medicamentos.

Os resultados obtidos suportam as evidências que a fisiopatologia da EM é complexa e de que a utilização de diferentes estratégias terapêuticas que levem em consideração o perfil inflamatório, metabólico e de estresse oxidativo, bem como o perfil genético, possam contribuir para um melhor prognóstico destes pacientes.

## 8 REFERÊNCIAS

ADIBHATLA RM; HATCHER JF. Role of lipids in brain injury and diseases. **Future Lipidology**, v. 2, p. 403–422, 2007.

ALLAN, S. E.; CROME, S. Q.; CRELLIN, N. K.; PASSERINI, L.; STEINER, T. S.; BACCHETTA, R.; RONCAROLO, M. G.; LEVINGS, M. K. Activation induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. **International Immunology**, v. 19, n. 4, p. 345- 354, 2007.

ALLEN. C.L.; BAYRAKTUTAN. U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. **International Journal of Stroke**, v. 4, p. 461-470, 2009.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes-2014. **Diabetes care**, v. 37, n. 1, p. 14-80, 2014.

BAHARNOORI. M.; LYONS. J.; DASTAGIR. A. et al. Nonfatal PML in a patient with multiple sclerosis treated with dimethyl fumarate. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 3, n. 5, e274, 2016.

BAHREINI, S. A. et al. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, p. 5-15, 2010.

BANIN HIRATA. B. K. et al. FOXP3 Allelic Variants and Haplotype Structures Are Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. **Disease Markers**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

BALAZS Z. PANZENBOECK U. HAMMER A. et al. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood brain barrier model. **Journal of Neurochemistry**, v. 89, p. 939–950, 2004.

BEECHAM. A. H. et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 11, p. 1353–1360, 2013.

BEGOLKA. W. S. et al. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 8, p. 4437–46, 1998.

BETTELLI. E. et al. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 7, p. 3299–306, 1998.

BIZZOZERO. O. A. et al. Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroscience Research**, v. 81, n. 5, p. 687–695, 2005.

BLUESTONE JA, ABBAS AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 253–7, 2003.

- BODLING AM; DENNEY, DR; LYNCH, SG. Cognitive aging in patients with multiple sclerosis: a cross-sectional analysis of speed processing. **Archives of Clinical Neuropsychology**, v. 24, p. 761-767, 2009.
- BRASIL. Sistema Único de Saúde. Disponível em <http://agenciabrasil.ebc.com.br/saude/noticia/2019-01/sus-vai-oferecer-medicamento-para-pacientes-com-esclerose-multipla>. Acessado em 02/04/2019.
- BROWNE. P. et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. **Neurology**, v. 83, n. 11, p. 1022–1024, 2014.
- BROWNLEE. W. J.; MILLER. D. H. Clinically isolated syndromes and the relationship to multiple sclerosis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 21, n. 12, p. 2065–2071, 2015.
- CANNELLA. B.; RAINE. C. S. Multiple sclerosis: Cytokine receptors on oligodendrocytes predict innate regulation. **Annals of Neurology**, v. 55, n. 1, p. 46–57, 2004.
- CALLEGARO D. et al. Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1990. **Neuroepidemiology**, v. 11, n. 1, p. 11-14, 1992.
- CALLEGARO. D. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 104, p. 208-213, 2001.
- CHANG, D. et al. Evaluation of Oxidative Stress in Colorectal Cancer Patients. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 4, p. 286–289, 2008.
- CHATAWAY. J. et al. THE MS-STAT TRIAL: High Dose Simvastatin Slows Brain Atrophy and Delays Disability in Secondary Progressive Multiple Sclerosis: A Phase II Placebo-Controlled Trial (PL02.001) **Neurology**, 2013.
- CHU. F. et al. The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 318, p. 1–7, 2018.
- CLAUSSEN. M.C.; KORN. T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. **Clinical Immunology**, 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. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 402–415, 2010.
- COMI. G; RADAELLI. M; SOELBERG. SP. Evolving concepts in the treatment of relapsing multiple sclerosis. **Lancet**, v. 389, n. 10076, p. 1347-1356, 2017.
- COMPSTON. A.; COLES. A. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 359, p. 1221-1231, 2002.
- COMPSTON. A.; COLES. A. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 372. n. 9648. p. 1502–1517, 2008.

CONFAVREUX. C.; O'CONNOR. P.; COMI. G. et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **The Lancet Neurology**, v. 13, p. 247–56, 2014.

DEIGNER. H.-P.; HABERKORN. U.; KINSCHERF. R. Apoptosis modulators in the therapy of neurodegenerative diseases. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 4, p. 747–764, 2000.

DENDROU. C. A.; FUGGER. L.; FRIESE. M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DING Y, XU J, BROMBERG JS. Regulatory T cell migration during an immune response. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 4, p. 174–80, 2012.

DUDDY. M. et al. Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6092–6099, 2007.

EVANS. C. et al. “Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review.” **Neuroepidemiology**, v. 40, n. 3, p. 195-210, 2013.

FAEH. D.; CHIOLERO. A.; PACCAUD. F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about? **Swiss medical weekly**, v. 136, p. 745–56, 2006.

FERRETTI. G. et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. **Multiple Sclerosis**, v. 11, n. 6, p. 677–682, 2005.

FINKELSZTEJN. A. et al. The prevalence of multiple sclerosis in Santa Maria. Rio Grande do Sul. Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 72, n. 2, p. 104-106, 2014.

FÖRSTER.M.; KÜRY. P.; AKTAS. O. et al. Managing risks with immune therapies in multiple sclerosis. **Drug Safety**, 2019. Epub.

FOX, E. J. Mechanisms of action of mitoxantrone. **Neurology**, v. 63, n. 12, p. 15-18, 2004.

FRANCIOTTA. D. et al. B cells and multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 9, p. 852–858, 2008.

FRIEDMAN. J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: GADOTH. N.; GOBEL. H.H. (editors). **Oxidative Stress and Free Radical Damage in Neurology**. 1° Edição. New York. Humana Press, p.19-21, 2011.

FRISCHER. J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1175–1189, 2009.

GAO. L. et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, n. 1, p. 51–56, 2010.

GILGUN-SHERKI. Y.; MELAMED. E.; OFFEN. D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 3, p. 261–268, 2004.

GIUBILEI F. ANTONINI G. DI LEGGE S. et al. Blood cholesterol and MRI activity in first clinical episode suggestive of multiple sclerosis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 106, p. 109–112, 2002.

GONZALEZ FLECHA. B.; LLESUY. S.; BOVERIS. A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 10, n. 2, p. 93–100, 1991.

GRABER. J. J. et al. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: Correlations with interferon dose and MRI response. **Journal of Neuroimmunology**, v. 185, n. 1–2, p. 168–174, 2007.

GRECO. A.; MINGHETTI. L.; LEVI. G. Isoprostanes, novel markers of oxidative injury, help understanding the pathogenesis of neurodegenerative disease. **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9-10, p. 1357-1364, 2000.

GRUNDY. S. M. et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. **Circulation**, v. 112, n. 17. p. 2735-2752, 2005.

GUZEL. I. et al. Is there an association between the Expanded Disability Status Scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 79, n. 2, p. 54-57, 2016.

HAAS. J. et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 11, p. 3343–3352, 2005.

HARTUNG. H. -P et al. Circulating adhesion molecules and tumor necrosis factor receptor in multiple sclerosis: Correlation with magnetic resonance imaging. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 2, p. 186–193, 1995.

HASHEMI. V. et al. Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. **Immunology Letters**, v. 204, p. 16–22, 2018.

HE. Y. et al. FoxP3 rs3761548 polymorphism predicts autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1665–1671, 2013.

HEMMER. B.; KERSCHENSTEINER. M.; KORN. T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 4, p. 406–419, 2015.

HO. P. I. et al. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: Glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 5, p. 694–702, 2002.

HOLMOY. T.; VON DER LIPPE. H.; LEEGAARD. T.M. Listeria monocytogenes infection associated with alemtuzumab - a case for better preventive strategies. **BMC Neurology**, v. 17, n. 1, p. 65, 2017.

INOUE. N. et al. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 162, n. 3, p. 402–406, 2010.

IRANI. D.N. Immunological mechanism in multiple sclerosis. Review. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 5, p.257-269. 2005.

ISSAZADEH. S. et al. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Journal of Neuroimmunology**, v. 69, n. 1–2, p. 103–115, 1996.

JAHAN. P. et al. Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with nondermatomal vitiligo: A study from India. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 2, p. 262–266, 2013.

JAMES. P. A. 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 : The Journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 5, p. 507–20, 2014.

JOVANOVIĆ, DV et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1β and TNF-α, by human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 3513-21, 1998.

KAIMEN-MACIEL, DR. et al. CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, n. 3, p. 337-44, 2007.

KAIMEN-MACIEL. D. R. et al. HLA-DRB1\* allele-associated genetic susceptibility and protection against multiple sclerosis in Brazilian patients. **Molecular Medicine Reports**, v. 2, n. 6, p. 993–8, 2009.

KAIMEN-MACIEL. D. R.; MEDEIROS, M. C. R. Esclerose Múltipla: prevalência em duas cidades no norte do Paraná. O Dendrito. Curitiba - PR. v. 9. n.4. p. 96-97, 2003.

KALINOWSKA-ŁYSZCZARZ. A. et al. Serum sPECAM-1 and sVCAM-1 levels are associated with conversion to multiple sclerosis in patients with optic neuritis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 300, p. 11–14, 2016.

- KALLAUR. A. P. et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. **Molecular Medicine Reports**, v. 7, p. 1010–1020, 2013.
- KALLAUR. A. P. et al. Tumor necrosis factor beta Nco1 polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 346, n. 1–2, p. 156–163, 2014.
- KALLAUR. A. P. et al. Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 1, p. 31–44, 2017.
- KANEDA, H. et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 1, p. 221–5, maio 2002.
- KAPPOS. L.; RADUE. E.W.; O’CONNOR. P. et al. FREEDOMS Study Group. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, p. 387–401, 2010.
- KASSI. E. et al. Metabolic syndrome: Definitions and controversies. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, p. 48, 2011.
- KOCH-HENRIKSEN. N.; SØRENSEN. P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 520–532, 2010.
- KOCH. M. et al. Progression in multiple sclerosis: Further evidence of an age dependent process. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 255, n. 1–2, p. 35–41, 2007.
- KOCH. M. W. et al. Serum NSE level and disability progression in multiple sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 350, n. 1–2, p. 46–50, 2015.
- KOLBINGER. F. et al. IL-17A and Multiple Sclerosis: Signaling Pathways, Producing Cells and Target Cells in the Central Nervous System. **Current Drug Targets**, v. 17, n. 16, p. 1882–1893, 2016.
- KURTZKE. J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, v. 33, n. 11, p. 1444–52, 1983.
- LANA-PEIXOTO. M.A. et al.. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte. Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 70, n. 2, p. 102-107, 2012.
- LEE. P. W.; SEVERIN. M. E.; LOVETT-RACKE. A. E. TGF- $\beta$  regulation of T cells in multiple sclerosis. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 3, p. 446–453, 2017.
- LINKER, R. A.; KIESEIER, B. C.; GOLD, R. Identification and development of new therapeutics for multiple sclerosis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 11, p. 558–565, 2008.
- LINKER R. A., LEE D-H., RYAN S., et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Brain**, v. 134, n. 3, p. 678–692, 2011

LJUBISAVLJEVIC. S. et al. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in plasma and CSF. **Neurochemistry International**, v. 62, n. 7, p. 988–997, 2013.

LONGONI. A. et al. Homocysteine Induces Glial Reactivity in Adult Rat Astrocyte Cultures. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 3, p. 1966–1976, 2018.

MARCHIONNI, M.A.; CANELLA, B.; HOBAN, C.; GAO, Y.L.; GARCIA-ARENAS, R.; LAWSON, D.; et al. Neuregulin in neuron/ glial interactions in the central nervous system. GGF2 diminishes autoimmune demyelination, promotes oligodendrocytes progenitor expansion, and enhances remyelination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.468, p.283-295, 1999.

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. C. R. et al. Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy. **Asthma Research and Practice**, v. 1, n. 1, p. 10, 2015.

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. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 76, p. 539-554, 2018.

MARRIE. R. A. et al. Vascular comorbidity is associated with more rapid disability progression in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 74, n. 13, p. 1041–1047, 2010.

MATTSON. M. P.; SHEA. T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 137–146, 2003.

MILLER. E. et al. Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. **Clinical Biochemistry**, v. 45, n. 1–2, p. 26–30, 2012.

MILO. R.; MILLER. A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4–5, p. 518–524, 2014.

MOGHADDASI. M. et al. Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: A case control study. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 115, n. 9, p. 1802–1805, 2013.

MOREL. A. et al. Markers of oxidative/nitrative damage of plasma proteins correlated with EDSS and BDI scores in patients with secondary progressive multiple sclerosis. **Redox Report**, v. 22, n. 6, p. 547–555, 2017.

*MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION.* Atlas da Esclerose Múltipla em 2013: mapeamento da esclerose múltipla no mundo. Disponível em <http://abem.org.br/esclerose/atlas-da-esclerose-multipla-2013>. Acessado em 2/4/2019.

MURPHY. Á. C. et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 24, n. 4, p. 641–651, 2010.

MUSELLA. A. et al. Interplay Between Age and Neuroinflammation in Multiple Sclerosis: Effects on Motor and Cognitive Functions. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 10, p. 1–13, 2018.

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

NAJAFIPOUR. H. et al. Circulating Levels of Interleukin-35 in Patients with Multiple Sclerosis: Evaluation of the Influences of FOXP3 Gene Polymorphism and Treatment Program. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 55, n. 4, p. 891–897, 2014.

NAVARRO-GONZÁLVEZ. J. A.; GARCÍA-BENAYAS. C.; ARENAS. J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 3, p. 679–681, 1998.

NEWCOMBE J. LI H. CUZNER ML. Low density lipoprotein uptake by macrophages in multiple sclerosis plaques: Implications for pathogenesis. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 20, p. 152–162, 1994.

O'CONNOR. P.; WOLINSKY. J.S.; CONFAVREUX. C. et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis **The New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1293–303, 2011.

OCKENFELS, H.M. et al. The antipsoriatic agent dimethylfumarate immunomodulates T-cell cytokine secretion and inhibits cytokines of the psoriatic cytokine network. **British Journal of Dermatology**, v. 139, p. 390–395, 1998.

ODA. J. M. M. et al. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: Imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. **Journal of Genetics**, v. 92, n. 1, p. 163–171, 2013.

OH. J.; VIDAL-JORDANA. A.; MONTALBAN. X. Multiple sclerosis: clinical aspects. **Current Opinion in Neurology**, v. 31, n. 6, p. 752–759, 2018.

OLIVEIRA. S. R. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: Association with the expanded disability status scale. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 321, n. 1–2, p. 49–53, 2012.

OLIVEIRA. S. R et al. Immunopathological mechanisms and oxidative stress damage in multiple sclerosis. In: Isaias Dichi; José Wander Breganó; Andréa Name Colado Simão; Rubens Cecchini. (Org.). **Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases**. 1ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group. 2014: 549-588.

OLIVEIRA. S. R. et al. Disability in patients with multiple sclerosis: Influence of insulin resistance, adiposity, and oxidative stress. **Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 268–273, 2014.

- OLIVEIRA. S. R. et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. **Metabolic Brain Disease**, v. 33, n. 5, p. 1393-1399, 2018.
- OLSSON. T.; BARCELLOS. L. F.; ALFREDSSON. L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 26–36, 2016.
- ORTONA. E. et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 52, n. 2, p. 205–12, 2011.
- 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.
- PEREIRA. L. M. S. et al. Regulatory T cell and forkhead box protein 3 as modulators of immune homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1–24, 2017.
- PINHAS-HAMIEL. O. et al. Prevalence of overweight, obesity and metabolic syndrome components in multiple sclerosis patients with significant disability. **European Journal of Neurology**, v. 22, n. 9, p. 1275–1279, 2015.
- PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 77, n. 2, p. 188–192, 2007.
- PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. Markers of oxidative protein damage in plasma and urine of type 2 diabetic patients. **British Journal of Biomedical Science**, v. 66, n. 4, p. 194–9, 2009.
- POLMAN. C. H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 292–302, 2011.
- RAMSARANSING. G. S. M. et al. Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 77, n. 2, p. 189–92, 2006.
- REALE. M.; SANCHEZ-RAMON. S. Lipids at the Cross-road of Autoimmunity in Multiple Sclerosis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 176–192, 2017.
- REAVEN. G. M. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. **Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 65-66, 1997.
- REICH. D. S.; LUCCHINETTI. C. F.; CALABRESI. P. A. Multiple Sclerosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 2, p. 169–180, 2018.
- REZNICK. A. Z.; PACKER. L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.
- RIBEIRO. S. B. F. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba. Minas Gerais. Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 69, n. 2, p. 184-187, 2011.

ROCHA. F.C. et al. Multiple sclerosis in Botucatu, Brazil. A population study. **Multiple Sclerosis**, v. 8, Suppl. p. S41-S42, 2002.

RODGERS. J. M.; MILLER. S. D. Cytokine control of inflammation and repair in the pathology of multiple sclerosis. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 85, n. 4, p. 447–468, 2012.

ROXBURGH. R. H. S. R. et al. Multiple sclerosis severity score: Using disability and disease duration to rate disease severity. **Neurology**, v. 64, n. 7, p. 1144–1151, 2005.

ROY, S. et al. Differential effects of aging on motor and cognitive functioning in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, v. 23, p. 1385-1393, 2017.

RUCK T., et al. Alemtuzumab in multiple sclerosis: mechanism of action and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 16414–39, 2015.

RUSSO. C. et al. Hyperhomocysteinemia is associated with cognitive impairment in multiple sclerosis. **Journal of Neurology**, v. 255, n. 1, p. 64–69, 2008.

SADOWSKA-BARTOSZ. I.; ADAMCZYK-SOWA. M.; GALINIAK S. et al. Oxidative modification of serum proteins in multiple sclerosis. **Neurochemistry International**, v. 63, n. 5, p. 507-516, 2013.

SAKAGUSHI. S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. **Cell**, v. 101, p. 455-458, 2000.

SAYRE. L. M.; PERRY. G.; SMITH. M. A. Oxidative Stress and Neurotoxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172–188, 2008.

SCANNEVIN RH, CHOLLATE S, JUNG M, et al. Fumarates Promote Cytoprotection of Central Nervous System Cells against Oxidative Stress via the Nuclear Factor (ErythroidDerived 2)-Like 2 Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 341, p. 274–284, 2012.

SCHMIDT, H; WILLIAMSON, D.; ASHLEY-KOCH, A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a huge review. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, p. 1097-1109, 2007.

SERVETTAZ, A. et al. Radical oxygen species production induced by advanced oxidation protein products predicts clinical evolution and response to treatment in systemic sclerosis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 66, n. 9, p. 1202–9, 2007.

SESHADRI. S. Elevated plasma homocysteine levels: Risk factor or risk marker for the development of dementia and Alzheimer's disease? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n. 4, p. 393–398, 2006.

SHEIKH. Z.; AHMAD. R.; SHEIKH. N. et al. Enhanced recognition of reactive oxygen species damage human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. **Autoimmunity**, v.40, p. 512-520, 2007.

SHEN. Z. et al. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 1–2, p. 226–241, 2010.

ŠKOVIEROVÁ. H. et al. Effect of homocysteine on survival of human glial cells. **Physiological Research**, v. 64, n. 5, p. 747–754, 2015.

ŠKOVIEROVÁ. H. et al. The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1–18, 2016.

SOSPEDRA. M.; MARTIN. R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 683–747, 2005.

SOSPEDRA. M.; MARTIN. R. Immunology of Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology**, v. 36, n. 02, p. 115–127, 2016.

TAVAKOLI. N; HAMBLY. B. D.; SULLIVAN. D. R.; BAO. S. Forkhead box protein 3: essential immune regulatory role. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 2369-2373, 2008.

TETTEY. P. et al. An adverse lipid profile is associated with disability and progression in disability, in people with MS. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 13, p. 1737–1744, 2014.

TEUNISSEN. C. E. et al. Serum homocysteine levels in relation to clinical progression in multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 79, n. 12, p. 1349–1353, 2008.

THOMPSON. A. J. et al. Multiple sclerosis. **The Lancet**, v. 391, n. 10130, p. 1622–1636, 2018a.

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

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

TONE, M.; GREENE, M. Cooperative regulatory events and Foxp3 expression. **Nature Immunology**, New York, v. 12 n. 1, p. 14-16, 2011.

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

VASCONCELOS. S.M.L.; GOULART. M.O.F.; MOURA. J.B.F. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

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. **Multiple Sclerosis**, v. 20, p. 705–16, 2014.

- VERSINI. M. et al. Obesity in autoimmune diseases: Not a passive bystander. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 9, p. 981–1000, 2014.
- 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. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v.2, p. 103–118, 2015.
- WEINSTOCK-GUTTMAN. B. et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 127, 2011.
- WILLIS. M.D.; HARDING. K.E.; PICKERSGILL. T.P. et al. Alemtuzumab for multiple sclerosis: Long term follow-up in a multi-centre cohort. **Multiple Sclerosis**, v. 22, p. 1215-23, 2016.
- WINKELMANN. A.; LOEBERMANN. M.; REISINGER. E.C. et al. Disease-modifying therapies and infectious risks in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, v. 12, p. 217-33, 2016.
- WITKO-SARSAT. V. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. **Kidney International**, v. 49, n. 5, p. 1304–13, 1996.
- WITKO-SARSAT. V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 5, p. 2524–32, 1998.
- WYSS-CORAY. T. et al. Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 77, n. 1, p. 45–50, 1997.
- YAMOUT. B.I.; ALROUGHANI. R. Multiple Sclerosis. **Seminars in Neurology**, v. 38, p. 212-225, 2018.
- ZHANG. L. et al. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. **Human Immunology**, v. 70, n. 11, p. 930–934, 2009.
- ZHU. Y.; HE. Z. Y.; LIU. H. N. Meta-analysis of the relationship between homocysteine, vitamin B12, folate, and multiple sclerosis. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 933–938, 2011.

**ANEXOS**

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
**Universidade Estadual de Londrina**  
**Registro CONEP 5231**

<b>Parecer CEP/UEL:</b>	250/2013
<b>CAAE:</b>	22290913.9.0000.5231
<b>Data da Relatoria:</b>	17/03/2014
<b>Pesquisador(a):</b>	Edna Maria Vissoci Reiche
<b>Unidade/Órgão:</b>	CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

**"AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA: UM ESTUDO DE SEGUIMENTO."**

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 17 de março de 2014.

  
**Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli**  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos  
 Universidade Estadual de Londrina



## APÊNDICES

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título da pesquisa:**

**Avaliação dos marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo em pacientes com esclerose múltipla: um estudo de seguimento.**

Prezado (a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa **“Avaliação dos marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo em pacientes com esclerose múltipla: um estudo de seguimento**. realizada no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina. O objetivo da pesquisa é verificar se há alterações nos exames laboratoriais que indicam inflamação e estresse oxidativo durante o período de 16 meses de acompanhamento da esclerose múltipla. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: 3 avaliações clínicas pelo médico neurologista, seguidas de coleta de sangue, com intervalo de 8 meses entre elas, realizada por profissionais treinados para esta função, com material descartável e tubos de coleta a vácuo, o que minimiza os possíveis desconfortos decorrentes deste procedimento, como dor e hematoma leves no local da punção.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são: 1) o entendimento dos mecanismos envolvidos nas alterações do estresse oxidativo e inflamação na esclerose múltipla, possibilitando o melhor monitoramento da doença e desenvolvimento de novos medicamentos; 2) identificação dos exames laboratoriais que estão relacionados com a progressão da doença e o grau de incapacidade que a doença causa, o que poderá contribuir para uma melhor monitoração e detecção mais precoce da progressão da doença;

Informamos que o (a) senhor (a) não terá nenhum custo nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode entrar em contato com a equipe de pesquisadores (Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Maria Vissoci Reiche ou Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andréa Name Colado Simão), pelo telefone: 3371-2321, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, localizado no HU, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371-2490.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

Pesquisadores Responsáveis

Edna Maria Vissoci Reiche

RG: 1.242.514-7

Andréa Name Colado Simão

RG: 6.226.736-4

\_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de pesquisa),  
tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO

Dados demográficos		Nº no projeto:	
Nome			
Endereço		Telefone:	
Data de nascimento			
Imunomodulador	( ) IFN- $\beta$ 1a ( ) IFN- $\beta$ 1b ( ) 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 ( $\leq$ 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.:			
Dados Clínicos			
IMC:	Peso:	Altura:	Circunferência:
Forma clínica	( ) RR ( ) SP ( ) PP ( ) CIS ( ) não definida		
EDSS 2013			
Atividade da doença	( ) Remissão ( ) Surto N° de surtos/ ano:		
RMN	N° lesões:	( ) Gd+ ( ) Gd-	Data RMN:
	Local:		
	Tipo de RMN:		
Inflamação/ Infecção	( ) Sim ( ) Não	Qual?	
Pós Menopausa	( ) Sim ( ) Não	Data última menstruação:	