



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WILDÉA LICE DE CARVALHO JENNINGS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
METABÓLICOS, HORMONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE
MÚLTIPLA:
UM ESTUDO DE SEGUIMENTO**

Londrina
2019

WILDÉA LICE DE CARVALHO JENNINGS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
METABÓLICOS, HORMONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO
E NITROSATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE
MÚLTIPLA:
UM ESTUDO DE SEGUIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

Orientadora: Prof. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Coorientadora: Prof. Dra. Andrea 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

Pereira, Wildéa Lice de Carvalho Jennings.

Avaliação dos marcadores inflamatórios, metabólicos, hormonais e de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla: um estudo de seguimento / Wildéa Lice de Carvalho Jennings Pereira. - Londrina, 2019.

140 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andrea 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. Incapacidade - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci . II. Simão, Andrea Name Colado . III. Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

WILDÉA LICE DE CARVALHO JENNINGS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
METABÓLICOS, HORMONAIS E DE ESTRESSE OXIDATIVO E
NITROSATIVO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA:
UM ESTUDO DE SEGUIMENTO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Damacio Ramón Kaimen Maciel
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Prof. Dr. Alexandre Carrilho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina. 26 de abril de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio ao longo do desenvolvimento e realização deste estudo.

À Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do CCS da UEL, orientadora desta tese, pelos constantes ensinamentos.

À Professora Dra. Andrea Name Colado Simão, docente do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do CCS da UEL, co-orientadora desta tese, pela valiosa colaboração durante o desenvolvimento do estudo.

Ao Professor Dr. Damacio Ramón Kaimen Maciel, pelas inestimáveis contribuições para o desenvolvimento da tese.

A todos os demais participantes do Grupo de Pesquisa em Imunologia Aplicada, em especial as doutorandas Tamires Flauzino e Daniela Frizon Alfieri, ao Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy e Prof Dr. Michael Maes que contribuíram significativamente para a realização deste trabalho.

À Novartis Biosciences S.A pelo suporte financeiro destinado ao desenvolvimento desta tese, por meio do Estudo de Iniciativa do Investigador CFTY720DBR07T desenvolvido pelos docentes e acadêmicos do Grupo de Pesquisa em Imunologia Aplicada.

PEREIRA, Wildéa Lice de Carvalho Jennings. **Avaliação dos marcadores inflamatórios, metabólicos, hormonais e de estresse oxidativo e nitrosativo em pacientes com esclerose múltipla**: um estudo de seguimento. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

Introdução: Fatores genéticos, hormonais, ambientais e alterações nas vias metabólicas e imunológicas desempenham um papel importante no desenvolvimento e no curso clínico da esclerose múltipla (EM). Além disso, uma associação entre prolactinemia com sexo, incapacidade e formas clínicas dos pacientes com EM foi relatada com resultados conflitantes. **Objetivo:** Avaliar o papel de biomarcadores inflamatórios, metabólicos, hormonais, de estresse oxidativo e nitrosativo (IMO&NS) na incapacidade, progressão da doença e formas clínicas, bem como a associação de prolactina com formas clínicas e acúmulo de incapacidade ao longo do tempo em pacientes com EM durante 16 meses. **Métodos:** Foi realizado um estudo longitudinal com a inclusão de 140 pacientes com EM, nas formas recorrente-remitente (EMRR) e progressivas de EM (EMProg) que incluíram as formas primariamente progressiva (EMPP) e secundariamente progressiva (EMSP). Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos na admissão (T0) e após oito (T8) e 16 meses (T16) da inclusão no estudo. A Escala do Estado de Incapacidade (EDSS) foi aplicada em T0, T8 e T16 e a variação dos escores de EDSS entre os tempos (Δ EDSS) foi calculada. Valores de Δ EDSS (como variável contínua ou dicotomizada como ≤ 0 ou > 0) foram usados para avaliar a progressão da incapacidade da doença. Os resultados foram expressos, também, como escores compostos ponderados por unidades z. **Resultados:** No primeiro artigo, foram avaliados 140, 128 e 122 pacientes com EM em T0, T8 e T16, respectivamente. A incapacidade em T0, T8 e T16 foi maior entre pacientes com EMProg do que aqueles com EMRR. Destes, 47 pacientes apresentaram acúmulo de incapacidade, aumentando de 3,4 (T0) para 4,5 (T8) e para 5,1 (T16). Idade, frequência de tabagismo, paratormônio (PTH) e homocisteína foram maiores, enquanto o ácido fólico foi menor entre esses pacientes. A variação da incapacidade (Δ EDSS) foi positivamente associada à hipertensão arterial sistêmica (HAS), idade, proteína C-reativa avaliada por método ultrasensível (usPCR), interleucina (IL)-17 e produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) e negativamente associada ao ácido fólico e cálcio. A variação do Δ EDSS de T8 a T16 foi predita pela redução de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] e ácido fólico de T0 a T8, e um aumento dos escores compostos pelas citocinas zIL-6+zIL-17-zIL-4 de T0 a T8. Além disso, 40,3% do Δ EDSS em T16 foi explicado pela HAS, idade, tabagismo e o escore homocisteína-ácido fólico em T16 (positivamente), 25(OH)D em T8 (negativamente) e zIL-6+zIL-17-IL-4 (positivamente) em T16. PTH, IL-6 e IL-4 foram mais elevados e 25(OH)D foi menor entre os pacientes com EMProg do que aqueles com EMRR. No segundo artigo, avaliamos os níveis séricos de prolactina e ferritina em 120 pacientes com EM, sendo 101 com EMRR e 19 com EMProg. Em uma primeira análise, a prolactina foi associada à incapacidade ao longo do tempo, mas após a introdução da idade e sexo na análise estatística, os efeitos da prolactina na incapacidade deixaram de ser significativos. Prolactina e ferritina não diferiram ao longo do tempo entre os dois grupos de estudo. Da mesma forma, após a introdução

de idade e sexo como variáveis confundidoras, os efeitos do diagnóstico sobre os níveis de prolactina deixaram de ser significativos ($P = 0,563$). A fim de avaliar o papel da prolactina na resposta inflamatória em pacientes com EM, avaliamos a associação de prolactina com ferritina. O resultado mostrou que a prolactina estava associada negativamente à ferritina ($P < 0,001$) e que o diagnóstico de RRMS e ProgMS e o tempo (T0, T8 e T16) não tiveram efeitos significativos nos níveis de ferritina ($P = 0,927$ e $P = 0,358$, respectivamente). No entanto, após a introdução de idade e sexo, esta associação entre prolactina e ferritina não foi mais significativa ($P = 0,599$), enquanto o diagnóstico (mas não o tempo) tornou-se significativo ($P = 0,001$). A ferritina foi maior nos pacientes com EMRR do que nos com EMProg ($239,5 \pm 10,3$ ng /mL *versus* $131,5 \pm 21,7$ ng/mL) após o ajuste para idade e sexo. Além disso, 21,6% da variação da incapacidade foi predita pela idade ($P < 0,001$) e sexo ($P = 0,049$), enquanto a prolactina não foi significativa. **Conclusões:** Os resultados mostraram que um conjunto de biomarcadores IMO&NS, juntamente com HAS e idade, foi fortemente associado com mudanças na incapacidade de pacientes com EM durante 16 meses de seguimento. A ativação imune e o metabolismo do PTH e do ácido fólico e homocisteína, bem como os baixos níveis de 25(OH)D e cálcio, desempenham um papel na progressão da EM e de suas formas clínicas. Esses biomarcadores podem ser úteis como possíveis biomarcadores laboratoriais para prever a progressão da incapacidade ao longo do tempo em pacientes com EM. Além disso, os resultados sugeriram que os efeitos da prolactina na incapacidade de pacientes com EM relatados previamente podem ser um resultado espúrio, porque essas correlações refletem as associações positivas de idade com a incapacidade e a associação negativa da idade com a prolactina.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Inflamação. Incapacidade. Homocisteína. Ácido fólico. Vitamina D. Prolactina.

PEREIRA, Wildéa Lice De Carvalho Jennings. **Evaluation of inflammatory, metabolic, hormonal, and oxidative and nitrosative stress biomarkers in patients with multiple sclerosis: a follow-up study.** 140 p. Thesis (Doctorate's degree in Health Science). Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

ABSTRACT

Background: Genetic, hormonal, environmental factors and changes in immunologic and metabolic pathways play an important role in the development and clinical course of multiple sclerosis (MS). Moreover, an association between prolactinemia with sex, disability and clinical forms of patients with MS has been reported with conflicting results. **Objective:** To evaluate the role of inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress (IMO&NS) biomarkers on disability, disease progression and clinical forms, as well as the association of prolactin with clinical forms and accumulating disability over time in MS patients during 16 months follow-up. **Methods:** A longitudinal study was carried out with 140 patients with MS, with both relapsing-remitting MS (RRMS) and progressive clinical forms of MS (ProgMS) that included MS primary progressive (PPMS) and MS secondary progressive (SPMS). Clinical and laboratory data were obtained at admission (T0), and eight (T8) and 16 months (T16) later the study inclusion. The Expanded Disability Status Score (EDSS) were applied at T0, T8 and T16 and the variation in the EDSS scores between the times (Δ EDSS) was calculated. Values of Δ EDSS, expressed as continuous or dichotomized variable as ≤ 0 or > 0) were used to evaluate the progression of disability. The results were also expressed as z unit weighted composite scores. **Results:** The study followed-up 140, 128, and 122 MS patients at T0, T8 and T16, respectively. The disability at T0, T8 and T16 were higher among patients with ProgMS than those with RRMS. Of them, 47 patients showed accumulating disability, increasing from 3.4 (T0) to 4.5 (T8) and to 5.1 (T16). Age, frequency of smoking, parathormone (PTH) and homocysteine (Hcy) were higher while folic acid was lower among these patients. The Δ EDSS were positively associated with systemic arterial hypertension (SAH), age, high sensitivity C-reactive protein measured with high sensitivity method (hsCRP), interleukin (IL)-17 and advanced oxidized protein products (AOPP), whilst they were negatively associated with folic acid and calcium. The Δ EDSS from T8 to T16 were predicted by decreased 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and folic acid from T0 to T8, and an increased cytokine composite score zIL-6+zIL-17-zIL-4 from T0 to T8. Moreover, 40.3% of the Δ EDSS at T16 was explained by the SAH, age, smoking and zHcy-zfolic acid at T16 (positively), 25(OH)D at T8 (negatively) and zIL-6+zIL-17-IL-4 (positively) at T16. PTH, IL-6, and IL-4 were higher and 25(OH)D was lower among patients with ProgMS than those with RRMS. Secondly, we evaluated prolactin and ferritin serum levels among 120 patients with MS. Prolactin and ferritin did not differ over time between both groups. Firstly, prolactin was associated with disability over time but after introducing age and sex, the effects of prolactin on disability were no longer significant. Prolactin was associated with age and sex, whereby age was positively associated with disability. In the same way, after introducing age and sex, the effects of diagnosis on prolactin levels were no longer significant ($P=0.563$). In order to evaluate the role of prolactin in inflammatory response among MS patients, we evaluated the association of prolactin with ferritin. The result showed that prolactin

was negatively associated with ferritin ($P<0.001$) and that RRMS and ProgMS diagnosis and time (T0, T8 and T16) have no significant effects on ferritin levels ($P=0.927$ and $P=0.358$, respectively). After introducing age and sex, this association between prolactin and ferritin was no longer significant ($P=0.599$), whilst diagnosis (but not time) became significant ($P=0.001$). Ferritin was higher in RRMS than in the ProgMS (239.5 ± 10.3 ng/mL *versus* 131.5 ± 21.7 ng/mL) after adjusting for age and sex. Moreover, 21.6% of the variance in the disability was predicted by age ($P<0.001$), and sex ($P=0.049$), while prolactin was not significant. **Conclusions:** The results showed that a set of IMO&NS biomarkers, together with SAH and age, was strongly associated with changes in the disability of MS patients during 16-month follow-up. Immune activation and PTH and Hcy-folic acid metabolism as well as low levels of 25(OH)D and calcium play a role in the progression of MS and its clinical forms. These biomarkers may prove useful as possible laboratory biomarkers to predict accumulating disability over time in MS patients. Moreover, the results suggested that the effects of prolactin on the disability of MS patients found in the literature may be spurious results because those correlations reflect the positive associations of age with the disability and the negative association of age with prolactin.

Keywords: Multiple sclerosis. Inflammation. Disability. Homocysteine. Folic acid. Vitamin D. Prolactin.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
Anti-MBP	Anticorpo contra a proteína básica de mielina
Anti-MOG	Anticorpo contra a glicoproteína da mielina de oligodendrócitos
AOPP	<i>Advanced oxidized protein products</i> (produtos avançados de oxidação proteica)
AT1R	<i>Angiotensin II receptor type 1</i> (Receptor 1 da angiotensina II)
AT2R	<i>Angiotensin II receptor type 2</i> (Receptor 2 da angiotensina II)
AU	Ácido úrico
BHE	Barreira hematoencefálica
BBB	<i>Blood brain barrier</i> (Barreira hematoencefálica)
BMI	<i>Body mass index</i> (Índice de massa corpórea)
CMIA	<i>Chemiluminescence microparticle immunoassay</i> (Imunoensaio de quimioluminescência por micropartículas)
CIS	<i>Clinically isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
CNS	<i>Central nervous system</i> (Sistema nervoso central)
DHODH	Desidrogenase de dihidro-ototato
DM	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
EBV	Epstein-Barr Vírus
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
EM	Esclerose múltipla
EMPP	Esclerose múltipla primariamente progressiva
EMRP	Esclerose múltipla recorrente progressiva

EMRR	Esclerose múltipla remitente-recorrente
EMSP	Esclerose múltipla secundariamente progressiva
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF23	Fator de crescimento de fibroblastos 23
GH	<i>Growth hormone</i> (Hormônio do crescimento)
GLM	<i>General linear model</i> (Análise multivariada de modelo linear geral)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos)
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hcy	Homocisteína
hsCRP	<i>High sensitivity C-reactive protein</i> (proteína C-reativa de alta sensibilidade)
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i> (Antígeno leucocitário Humano)
HHV-4	Herpes vírus humano tipo 4
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
IFN	Interferon
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina- 1 beta
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
<i>IL7R</i>	Receptor de IL-7
IL-9	Interleucina-9
IL-10	Interleucina-10
IL-15	Interleucina-15
IL-17	Interleucina-17
IL-21	Interleucina-21

IL-23	Interleucina 23
IMC	Índice de massa corpórea
IMO&NS	<i>Inflammatory, metabolic, oxidative and nitrosative stress</i> (Inflamatório, metabólico e estresse oxidativo e nitrosativo)
iNOs	Enzimas óxido nítrico sintase induzível
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen-1</i> (Antígeno1 associado à função linfocitária)
LMM	<i>Linear mixed model</i> (Análise de modelo misto linear)
MBP	<i>Myelin basic protein</i> (Proteína básica de mielina)
MetS	<i>Metabolic Syndrome</i> (Síndrome metabólica)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> (Glicoproteína da mielina do Oligodendrócito)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NARCOMS	<i>North American Research Committee on Multiple Sclerosis</i> (Comitê Norte-Americano de Pesquisa em Esclerose Múltipla)
NMDA	N-metil-D-metil-aspartato
NMO	Neuromielite óptica
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NOx	Metabólitos do óxido nítrico
PCR	Proteína C reativa
<i>PRL</i>	Gene da prolactina
<i>PRLR</i>	Gene do receptor da prolactina
PTH	Paratormônio
RIS	<i>Radiologically isolated syndrome</i> (Síndrome radiologicamente isolada)
RNM	Ressonância nuclear magnética
SH	Sulfidrila

SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina-angiotensina
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i> (Esfingosina-1-fosfato)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)
TRAP	<i>Total radical-trapping antioxidant parameter</i> (Parâmetro antioxidante total do plasma)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão celular vascular 1)
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VLA4	<i>Very late antigen 4</i> (Antígeno muito tardio 4)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	EPIDEMIOLOGIA	15
1.2	ETIOLOGIA	16
1.2.1	Vitamina D	16
1.2.2	Epstein-Barr vírus	17
1.3	SINTOMAS	17
1.4	FORMAS CLÍNICAS	18
1.5	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS	20
1.5.1	Disseminação no espaço	20
1.5.2	Disseminação no tempo	20
1.5.3	EMPP	20
1.6	INCAPACIDADE E PROGRESSÃO DA DOENÇA	22
1.7	FISIOPATOLOGIA	22
1.7.1	Inflamação	22
1.7.2	Estresse oxidativo	24
1.7.3	Fatores envolvidos na patogênese da EM, incapacidade e formas clínicas	28
1.7.4	Alterações metabólicas associadas à incapacidade e formas clínicas da EM	29
1.7.5	Alterações hormonais associadas à incapacidade e formas clínicas da EM	32
1.8	TRATAMENTO	34
1.8.1	Sintomático	34
1.8.2	Fase aguda	34
1.8.3	Modificador da doença	34
2	JUSTIFICATIVA	38
3	OBJETIVOS	39
3.1	OBJETIVO GERAL	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39

4	MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	40
4.2	DELINEAMENTO	40
4.3	PARTICIPANTES DO ESTUDO	41
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	41
4.5	DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLOGICOS, ANTROPOMÉTRICOS E CLÍNICOS.....	41
4.6	AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	42
4.6.1	Obtenção de amostra	42
4.6.2	Biomarcadores inflamatórios	42
4.6.3	Biomarcadores metabólicos/hormonais.....	42
4.6.4	Biomarcadores do estresse oxidativo/nitrosativo.....	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5	RESULTADOS	45
5.1	ARTIGO 1	46
5.2	ARTIGO 2.....	93
6	CONCLUSÕES	115
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
8	REFERÊNCIAS	118
9	ANEXO	137
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UEL	141
10	APÊNDICES	138
	APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	138
	APÊNDICE B - Questionário do Projeto EM.....	140

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, inflamatória, desmielinizante e complexa do sistema nervoso central (SNC), a qual foi descoberta primeiramente pelo cientista Jean-Martin Charcot em 1868 (ORTIZ et al., 2013; KORIEEM, 2016). Apresenta curso clínico variável e acomete o encéfalo, medula espinhal, nervos ópticos, poupando as raízes dos nervos e os nervos periféricos (ORTIZ et al., 2013).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

Aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo vivem com EM, sendo a causa mais comum de incapacidade neurológica em adultos jovens, acometendo principalmente indivíduos na idade de 20-50 anos (KORIEEM, 2016; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

Em cerca de 70% dos casos a doença se inicia entre os 20 e os 40 anos de idade, com um pico de incidência aos 30 anos, sendo apenas 10% dos diagnósticos realizados em doentes com idade inferior a 20 anos (POSER; BAUER; POSER, 1982). Seus aspectos clínicos e prevalência variam consideravelmente em todo o mundo, sendo maior nas regiões localizadas entre os paralelos 44 e 64 N (RIBEIRO, 2011). Frequentemente as populações do norte Europeu são as mais atingidas, o que pode ser explicado pela diminuição dos níveis da vitamina D devido à baixa exposição solar nesses países, configurando uma hipótese para o desenvolvimento da doença (KORIEEM, 2016). São consideradas áreas de alta incidência as que possuem acima de 30 casos por 100 mil habitantes, áreas de prevalência média de 5 a 30 casos por 100 mil habitantes, e baixa prevalência quando o número de casos é menor que 5 por 100 mil habitantes (NOSEWORTHY et al., 2000; CALLEGARO, 2005; RIBEIRO, 2011).

A EM parece ser menos frequente na América do Sul em comparação com países do hemisfério norte (NOSEWORTHY et al., 2000). No Brasil, sua taxa de prevalência é de aproximadamente 15 casos por cada 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). Anos mais tarde, uma reavaliação da epidemiologia de EM mostrou uma taxa de prevalência de 15,0 por 100.000 (CALLEGARO et al., 2001). Uma terceira investigação de prevalência, realizada em Botucatu, São Paulo, revelou uma taxa de prevalência de 17 por 100.000 habitantes (ROCHA et al., 2002). Entre os habitantes do Estado de Minas Gerais, 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, um estudo mostrou uma prevalência de 27,2 por 100.000 habitantes, a maior taxa relatada no Brasil (FINKELSZTEJN et al., 2014). Acredita-se que essa diferença entre as regiões brasileiras decorra em parte da diversidade genética e da

miscigenação da população. Estes fatores, aliados a grande extensão territorial brasileira justificariam a concentração de determinadas características genéticas e fenotípicas em algumas regiões do país (GRZESIUK, 2006).

Assim como em outras doenças autoimunes, a EM é universalmente mais prevalente em mulheres do que em homens (HARBO; GOLD; TINTORÉ, 2013), com uma relação mulher/homem de cerca de 2:1 (CONFAVREUX; AIMARD; DEVIC, 1980; WEISHENKER et al., 1989).

Estudos evidenciaram que as mulheres geralmente iniciam a doença antes que os homens; no entanto, há uma discreta menor prevalência no sexo feminino da doença progressiva primária assim como menor progressão da incapacidade nas mulheres do que nos homens (BERGAMASCHI, 2007).

1.2 ETIOLOGIA

A etiologia da EM é complexa e envolve a interação entre diversos fatores ambientais e genéticos (ASCHERIO; MUNGER; LÜNEMANN, 2012). Os fatores ambientais mais importantes são hipovitaminose D (baixa exposição solar), agentes infecciosos como Epstein Barr Vírus (EBV), agentes químicos, tabaco, dieta (obesidade) (GRIGORIADIS; VAN PESCH, 2015). Entre os fatores genéticos, há os associados à região genômica do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), também denominados genes que codificam as moléculas de antígeno leucocitário humano (*HLA*) (HOHLFELD; WEKERLE, 2004; SOSPEDRA; MARTIN, 2005). O haplótipo *HLA-DR2* (*-DRB1*1501, -DQA1*0102, -DQB1*0602*) do sistema HLA classe II foi associado com a EM em pacientes caucasianos (RAMAGOPALAN; DYMENT; EBERS, 2008), assim como inúmeros genes *não-HLA* como os que codificam as moléculas antagonista do receptor de interleucina (IL)-2 (*IL2RA*), molécula de adesão molecular 1 (*ICAM1*), receptor de IL-7 (*IL7R*), entre outros (BAHREINI et al., 2010). Evidências apontam que a EM não é causada pelo efeito de um único gene, mas pelo efeito de vários genes em que cada um deles contribui para o risco de desenvolver a doença (SAWCER et al., 2011).

1.2.1 Vitamina D

A associação entre doenças autoimunes e vitamina D tem sido estabelecida nos últimos anos (HOLICK, 2005). Vitamina D é um hormônio que participa do metabolismo ósseo e da homeostase do cálcio (GRANT; HOLICK, 2005). Apresenta ainda um papel na diferenciação celular, inibição do crescimento celular e modulação do sistema imune (BIKLE, 2011). A predominância do clima temperado no hemisfério norte, com longos períodos de baixa radiação solar e a alta prevalência de hipovitaminose D constatada em estudos realizados em

populações desses países levaram à hipótese de que essa deficiência possa explicar a distribuição geográfica da EM (HOSSEIN-NEZHAD; HOLICK, 2013; MARTINELLI et al., 2013; FREEDMAN et al., 2012). Além disso, estudos têm sugerido que níveis séricos adequados de vitamina D podem auxiliar na redução do risco de desenvolvimento da doença (BIKLE, 2011; MARTINELLI et al., 2013). Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que a deficiência de vitamina D está relacionada com maior incapacidade nos pacientes com a forma recorrente-remitente da EM (EMRR) (OLIVEIRA et al., 2017).

1.2.2 Epstein-Barr vírus (EBV)

O EBV ou Herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4) é o agente etiológico da mononucleose infecciosa e está associado a doenças malignas como o linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, linfoma de Burkitt e carcinoma de nasofaringe. Estudos epidemiológicos e moleculares têm estabelecido o EBV como um fator de risco para o desenvolvimento da EM e, além disso, que a patogênese da EM deva envolver a resposta à infecção pelo vírus (JI; PERCHELLET; GOVERMAN, 2010; BARUKČIĆ; BARUKČIĆ, 2016).

A mononucleose infecciosa e elevados níveis de anticorpos específicos para o EBV estão correlacionados com o aumento do risco para desenvolver EM. Acredita-se que a infecção latente pelo EBV leve à reativação viral no SNC, resultando em células B transformadas pelo EBV nos espaços meníngeo e perivascular, expressando proteínas virais que poderiam ativar células T efectoras (LOSSIUS et al., 2014).

Além disso, uma infecção viral crônica pelo EBV pode ocasionar um aumento do número de células T de memória vírus-específicas e esse aumento pode estar acentuado na EM (SNYDER et al., 2008).

1.3 SINTOMAS

A apresentação clínica inicial da EM é variável, estimando-se que em 50% dos casos exista disfunção isolada dos feixes longos (predomínio de alterações sensitivas), em 15% ocorra neurite óptica isolada, em 10% ocorra disfunção do tronco cerebral e em 25% ocorram combinações dos anteriores (CONFAVREUX; COMPSTON, 2006). Os sintomas são diversos e dependem da área acometida do SNC. A fadiga é o sintoma mais comum e incapacitante da EM (PENNER; CALABRESE, 2010). Depressão, humor instável, nistagmo, neurite óptica, diplopia, disartria, dor, alterações de sensibilidade, fraqueza muscular, espasmos musculares, incoordenação, distúrbios na fala, retenção urinária, incontinências fecal e urinária, constipação ou diarreia são alguns dos sintomas apresentados pelos pacientes (KORIEM, 2016). Alguns

pacientes podem apresentar piora transitória dos sinais e sintomas da EM durante um banho quente ou durante a execução de exercícios extenuantes, caracterizando o chamado fenômeno de Uhthoff (SÁ, 2012).

1.4 FORMAS CLÍNICAS

De acordo com a classificação fenotípica da EM, a doença pode ser classificada em síndrome clinicamente isolada (CIS) ativa e inativa, EMRR ativa e inativa, e em doença progressiva. A doença progressiva é ainda subdividida em secundariamente progressiva (EMSP) e primariamente progressiva (EMPP). As formas progressivas podem ainda ser classificadas em ativa e com progressão, ativa e sem progressão, inativa mas com progressão, e inativa e sem progressão (doença estável). A presença de surtos caracteriza a atividade clínica da doença, enquanto que as lesões na ressonância nuclear magnética (RNM) com realce pelo contraste gadolínico no T1, ou o aumento do volume ou do número das lesões hiperintensas em T2 caracterizam a atividade radiológica. Autores sugerem que a progressão da doença seja determinada anualmente por meio da avaliação do histórico de mudanças clínicas do paciente ou por meio de mudanças em escalas de medidas objetivas (LUBLIN et al., 2014).

A CIS é a primeira apresentação clínica de uma doença que apresenta características desmielinizantes e inflamatórias. Em torno de 30-70% dos pacientes evoluem para EM, de acordo com o critério da disseminação no tempo (LUBLIN et al., 2014; KORIEEM, 2016).

A EMRR ocorre em cerca de 85% dos doentes, verificando-se surtos claramente, com recuperação completa ou parcial, sem progressão da doença entre surtos. Em 80 a 90% dos casos esta forma evolui para a EM secundariamente progressiva (EMSP), na qual ocorre progressão da incapacidade (LUBLIN; REINGOLD, 1996; NOSEWORTHY, 1999; HAUSER; OKSENBERG, 2006). O surto é definido como um novo sintoma neurológico ou um agravamento de um antigo sintoma durante um período superior a um dia (SELLEBJERG et al., 2011).

O intervalo de tempo entre os dois primeiros surtos e o número de surtos parecem se relacionar com a progressão da incapacidade, verificando-se uma progressão mais rápida quando o intervalo é menor, e quando ocorre um elevado número de surtos durante os primeiros dois anos de doença (SCALFARI et al., 2010). Após os primeiros dois anos de doença, o impacto do número de surtos no prognóstico parece ser menor (SCALFARI et al., 2014) e se estima que cada surto provoque um agravamento em média de 0,24 a 0,57 na escala EDSS (LUBLIN; BAIER; CUTTER, 2003). Quando os sintomas surgem na EMRR, frequentemente são resolvidos, ficando uma pequena ou nenhuma incapacidade para o paciente (PITTOCK; RODRIGUEZ, 2008). A interação entre processos inflamatórios e

neurodegenerativos na EM resulta em episódios agudos de piora, os surtos, e o acúmulo progressivo de incapacidade (ORTIZ et al., 2013).

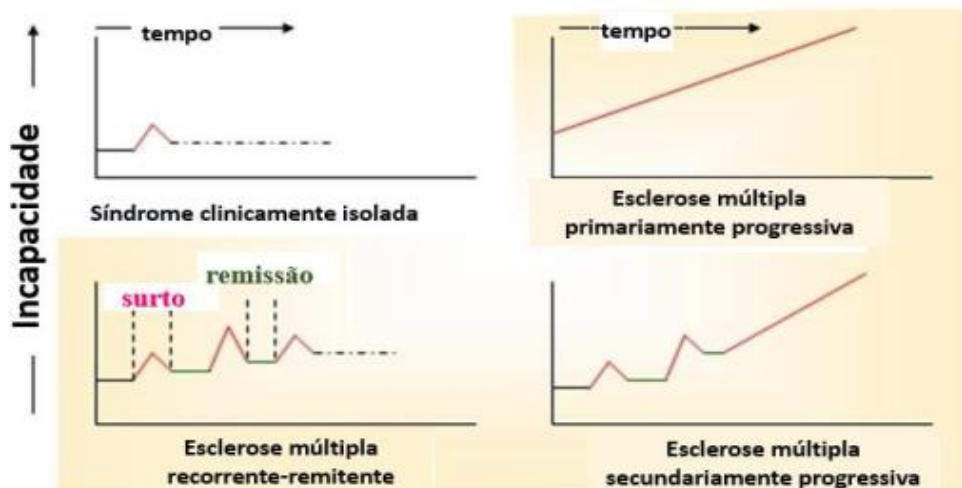
A EMPP se caracteriza por progressão da incapacidade e discreta melhora dos sintomas da EM (TRAPP; NAVE, 2008; DUTTA, TRAPP, 2011). De 10 a 20% dos pacientes com EMRR progridem para EMPP, com duração de aproximadamente 10 anos para que esta conversão ocorra (LUBLIN; REINGOLD, 1996; COMPOSTON; COLES, 2008).

A EMSP é caracterizada por surtos e discreta remissão. Aproximadamente 65% dos pacientes com EMRR evoluem para EMSP ao longo de 19 anos da doença (ROVARIS et al., 2006; KORIEM, 2016).

O Painel Internacional da EM acrescentou ainda o conceito de síndrome radiologicamente isolada (RIS), a qual ocorre quando incidentalmente se encontram sinais em exames de imagem sugestivos de desmielinização e inflamação, na ausência de sinais clínicos ou sintomas. Dependendo da morfologia e das lesões detectadas na RNM, deve-se suspeitar da evolução para EM (LUBLIN et al., 2014; KORIEM, 2016).

A **Figura 1** ilustra a representação gráfica das formas clínicas da (EM).

Figura 1 Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla



Fonte: Adaptado de sbv IMPROVER Systems Biology Verification. Disponível em: < <https://www.sbvimprover.com/challenge-1/challenge/ms-stage> >

1.5 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Os critérios diagnósticos de McDonald para EM passaram por uma revisão realizada por um grupo autores (THOMPSON et al., 2018), conforme o esquema apresentado no **Quadro 1**, e foram estabelecidos os seguintes:

1.5.1 Disseminação no espaço

A presença de uma ou mais lesões hiperintensas em T2 da RNM, em pelo menos duas de quatro áreas do SNC: periventricular, justacortical, infratentorial ou na medula espinhal.

1.5.2 Disseminação no tempo

Pode ser demonstrada pela presença simultânea de lesões com ou sem realce pelo gadolínio a qualquer tempo ou por uma nova lesão hiperintensa em T2 ou com realce pelo gadolínio em uma RNM de controle de evolução, com referência à primeira RNM (ou basal), independentemente do tempo entre os exames.

1.5.3 EMPP

Para EMPP deve haver um ano de progressão da doença (determinado prospectiva ou retrospectivamente) mais a presença de dois dos três critérios seguintes: uma ou mais lesões hiperintensas em T2 em, pelo menos, uma área característica da EM (periventricular, cortical ou justacortical, ou infratentorial); duas ou mais lesões em hiperintensas em T2 na medula espinhal; ou bandas oligoclonais no líquido cefalorraquidiano (LCR) (THOMPSON et al., 2018).

Quadro 1 Critérios de McDonald 2017 revisados para o diagnóstico de Esclerose Múltipla

Critérios de McDonald 2017		
Número de surtos	Número de lesões com evidência clínica objetiva	Dados adicionais necessários para o diagnóstico de EM
≥2	≥2	Nenhum
≥2	1 (desde que haja evidências claras de um surto anterior envolvendo uma lesão em uma localização anatômica distinta)	Nenhum
≥2	1	Disseminação no espaço demonstrada por um surto novo em uma localização diferente ou pela RNM
1	≥2	Disseminação no tempo demonstrada por um novo surto ou RNM ou presença de bandas oligoclonais no LCR (em substituição à disseminação temporal)
1	1	Disseminação no espaço demonstrada por um novo surto envolvendo uma localização diferente ou pela RNM e disseminação no tempo demonstrada por um novo surto ou pela RNM ou Presença de bandas oligoclonais no LCR (em substituição à disseminação temporal)

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

EM: esclerose múltipla; RNM: ressonância nuclear magnética; LCR: líquido cefalorraquidiano

1.6 INCAPACIDADE E PROGRESSÃO DA DOENÇA

Para avaliar o grau de incapacidade de doentes com EM, Kurtzke (1983) elaborou a Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), um método de quantificar as incapacidades ocorridas durante a evolução da EM ao longo do tempo. A escala varia de 0 a 10 e quantifica as incapacidades em oito sistemas funcionais: piramidais, cerebelares, do tronco cerebral, sensitivas, vesicais, intestinais, visuais e mentais (KURTZKE, 1983). Na maioria dos estudos, os pacientes são categorizados com incapacidade leve (EDSS<3) ou moderada/grave (EDSS≥3) (KALLAUR et al., 2017). Ao longo do tempo, os pacientes com EM podem apresentar alterações nos escores de incapacidade. A progressão da incapacidade pode ser avaliada usando diferentes estratégias, como variação das alterações do EDSS em tempos diferentes (EDSS no tempo 2 – EDSS no tempo 1 = Δ EDSS). Considera-se progressão da incapacidade quando ocorre aumento de, pelo menos um ponto completo, para pacientes com um escore basal EDSS <6,0, e um agravamento de, pelo menos meio ponto, para pacientes com escore basal EDSS ≥ 6,0 (KOCH et al., 2007a). Existem ainda outras diversas escalas utilizadas para avaliar clinicamente pacientes com EM, como o escore de gravidade da esclerose múltipla (*Multiple Sclerosis Severity Score* – MSSS) (ROXBURGH et al., 2005) e o *Neurological Rating Scale* (NRS) (SIPE et al., 1984).

1.7 FISIOPATOLOGIA

Em relação à fisiopatologia da EM vários mecanismos lesivos estão envolvidos, como danos neuronal e axonal, desmielinização, inflamação autoimune, neurodegeneração, astrogliose, alterações metabólicas, remielinização, estresse oxidativo e excitotoxicidade (MILLER et al., 2012a; ORTIZ et al., 2016; SOSPEDRA; MARTIN, 2016).

1.7.1 Inflamação

A inflamação está presente em todos os estágios da EM. No entanto, é mais intensa na fase aguda da doença do que na fase crônica (POPESCU; LUCCHINETTI; 2012). O SNC é considerado um local imunologicamente privilegiado, uma vez que o acesso de células imunes circulantes é controlado pela barreira hematoencefálica (BHE) (RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012; ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2012). Em condições fisiológicas há uma entrada mínima e restrita de células imunes no SNC por meio do plexo coróide (KIVISÄKK et al., 2003).

Não se sabe ao certo se o processo que leva ao desenvolvimento da EM se inicia na periferia ou no SNC. No modelo que se inicia na periferia, células T autorreativas, as quais são ativadas nos sítios periféricos, geralmente por meio do mimetismo molecular, ativação de células próximas (*bystander*) ou pela coexpressão de receptores das células T com diferentes especificidades, alcançam o SNC com células B ativadas e monócitos. Esse modelo é consistente com o modelo da encefalomielite autoimune experimental (EAE) em animais (OLSON et al., 2001; HARKIOLAKI et al., 2009; MUENZ et al., 2009; JI; PERCHELLET; GOVERMAN, 2010).

Na EAE, as células T CD4⁺ são reativadas no SNC pelas células apresentadoras de antígenos, incluindo as células dendríticas CD11c⁺, resultando em uma resposta inflamatória que ocasiona o recrutamento de monócitos para o SNC, bem como a ativação de células T CD4⁺ *naïve*, o que impulsiona o processo inflamatório (MCMAHON et al., 2005).

Eventos extrínsecos ao SNC também podem deflagrar o desenvolvimento da doença, com infiltração de linfócitos autorreativos ocorrendo como um fenômeno secundário. Porém, ainda permanecem incertos quais seriam esses eventos extrínsecos ao SNC. A infecção viral do SNC tem sido apontada como um evento deflagrador dos mecanismos da resposta inflamatória (RANSOHOFF; ENGELHARDT, 2012; LOUVEAU et al., 2015).

A tolerância é um estado imunológico caracterizado por uma resposta efetora reduzida ou ausente, após um contato prévio com o antígeno. Se a tolerância imunológica é quebrada, por meio da redução da função das células T regulatórias (Treg) e/ou por elevação da resistência das células B efetoras e células T aos mecanismos supressores, as células B autorreativas e células T direcionadas para o SNC podem ser ativadas na periferia e se tornarem células efetoras agressivas devido ao mimetismo molecular, apresentação de autoantígenos e reconhecimento de antígenos liberados na periferia e sequestrados no SNC. Fatores genéticos e ambientais, como agentes infecciosos e componentes do tabaco contribuem para esses eventos. Uma vez ativadas, as células T CD8⁺, células T *helper* (Th)-1 e Th17, células B e células da imunidade inata podem invadir o SNC, gerando inflamação e lesão tecidual (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Na EM o processo inflamatório crônico leva à destruição da bainha de mielina e as citocinas estão intimamente envolvidas na progressão e regulação da doença. No SNC, citocinas afetam a permeabilidade da BHE, e a ativação da micróglia é responsável pela liberação de uma grande variedade de mediadores proinflamatórios (RODGERS; MILLER, 2012).

Tem sido relatado que citocinas exercem um papel importante na patogênese da EM, onde se observam mudanças no perfil de citocinas inflamatórias (IMAMURA et al., 1993; IMITOLA et al., 2005; KALLAUR et al., 2013). Estudos mostraram um aumento sérico significativo nos níveis de interleucina (IL)-6, IL-17 e interferon (IFN)- γ em pacientes com EM

quando comparados ao grupo controle (STELMASIAK et al., 2001; BRANDÃO et al., 2005). Outro estudo relatou que concentrações séricas de IL-18, IL-23 e IL-17 foram significativamente maiores em pacientes com EM que nos controles saudáveis (CHEN et al., 2012).

Biomarcadores refletem alterações do sistema imunológico, tal como o perfil de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que podem estar correlacionadas com a incapacidade e progressão na EM. Nosso grupo de pesquisa avaliou os níveis séricos de citocinas proinflamatórias incluindo fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-1 β , IL-6 e IL 12, Th1 (IFN- γ), Th17 (IL-17) e anti-inflamatórias Th2 (IL-4 e IL-10) em pacientes com EMRR e avaliamos a associação entre o perfil de citocinas e a progressão e atividade da doença. Nesse estudo foi demonstrado que os níveis séricos de IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-4 foram maiores nos pacientes com EMRR quando comparados aos controles. Além disso, os níveis séricos de IL-4 foram maiores em pacientes com EMRR com menor grau de incapacidade quando comparados aos que apresentavam incapacidade moderada/grave (KALLAUR et al., 2013). Esses resultados indicam que pacientes com EMRR, mesmo em fase de remissão clínica, apresentam um sistema complexo de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que podem interagir para modular a progressão e a atividade da doença.

1.7.2 Estresse oxidativo

Evidências indicam que o estresse oxidativo também exerce um papel importante na patogênese da EM. O estresse oxidativo é um estado celular em que as reações da homeostase redox estão alteradas e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) excedem a sua eliminação. Os neurônios do SNC são muito ativos durante o metabolismo oxidativo, estando constantemente expostos a níveis moderados de EROs, as quais são removidas por antioxidantes, como a melatonina, vitaminas D e E e glutathione; e por enzimas antioxidantes, como a catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Em doenças inflamatórias crônicas, como a EM, as defesas antioxidantes são escassas, o que leva ao estresse oxidativo. As EROs são derivadas do oxigênio e incluem o ânion superóxido ($O^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), enquanto que as ERNs são derivadas do nitrogênio e incluem o óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). O SNC é sensível ao dano oxidativo devido a considerável quantidade de lipídeos no tecido nervoso e ao seu intenso metabolismo mitocondrial que ocasiona níveis intracelulares elevados de ânions superóxido. Além disso, oligodendrócitos possuem elevados níveis de ferro e baixos níveis de enzimas antioxidantes (ORTIZ et al., 2016). Desta forma, EROs e ERNs podem desempenhar um papel chave por contribuir com a destruição da bainha de mielina (AMORINI et al., 2009).

Baixos níveis de antioxidantes ocasionam um aumento na atividade da lipoxigenase no SNC, estimulando a produção de leucotrienos, o que aumenta o processo imunoinflamatório no córtex cerebral. A destruição da mielina é ocasionada pela ativação de células T que por sua vez são ativadas na presença de radicais livres produzidos por meio da cascata do ácido araquidônico. Após, surgem os marcadores do estresse oxidativo associados com a atividade reduzida da superóxido dismutase e com o aumento da glutatona, aumento da hidroxila e da produção de peróxidos, os quais agem negativamente na mielina. Há modificações evidentes na atividade mitocondrial, principalmente nas suas membranas (ORTIZ et al., 2016).

Aumento dos níveis de biomarcadores do estresse oxidativo e diminuição dos níveis de substâncias antioxidantes têm sido encontrados no soro e no LCR de pacientes com EM (SAYRE; PERRY; SMITH, 2008). Estudos prévios demonstraram que produtos da peroxidação lipídica, como o hidroperóxido iniciado por terc-butil avaliado por quimioluminescência (CL-LOOH), estão aumentados no plasma de pacientes com EM, e sua elevação está associada ao aumento da incapacidade (NAIDOO; KNAPP, 1992; KOCH et al., 2007a; FERRETI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012). Além disso, a concentração de isoprostano no LCR, um biomarcador para peroxidação lipídica, foi três vezes maior em pacientes com EM quando comparados a indivíduos com outras doenças neurológicas (GRECO et al., 1999). Níveis de isoprostano podem ser facilmente detectados em fluidos biológicos e tecidos, sendo considerado um marcador sensível e específico de peroxidação lipídica *in vivo* (GRECO; MINGHETTI; LEVI, 2000). Um outro estudo mostrou que níveis de isoprostano na urina foram seis vezes mais elevados em pacientes com EMSP quando comparados aos controles (MILLER et al., 2012a), sugerindo que o isoprostano pode ser usado como um marcador não invasivo para determinar o estresse oxidativo e pode estar associado com formas progressivas da doença.

Enquanto a peroxidação lipídica tem sido estudada em doenças neurodegenerativas, a oxidação de proteínas tem recebido pouca atenção. Entre os vários biomarcadores disponíveis, a proteína carbonílica é considerada um biomarcador sensível, confiável e um marcador geral de oxidação proteica mediada por EROs (BIZZOZERO, 2009). Estudos relataram um aumento dos níveis plasmáticos de proteínas carbonílicas em pacientes com EM quando comparados a indivíduos saudáveis (MILLER et al., 2012a; OLIVEIRA et al., 2012). Pela primeira vez, nosso grupo de pesquisa demonstrou, em 2012, uma correlação positiva entre a incapacidade da doença, avaliada pelo EDSS, e níveis plasmáticos de proteínas carbonílicas em pacientes com EM (OLIVEIRA et al., 2012).

O NO, cuja síntese se realiza por ação da enzima óxido nítrico sintetase (NOS), a partir do aminoácido L-arginina, participa de uma variedade de funções biológicas como imunorregulação de reações inflamatórias, *downregulation* da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), expressão de moléculas MHC de classe II nos macrófagos, indução da apoptose nas células T CD4⁺, regulação da cadeia respiratória mitocondrial, inibição da

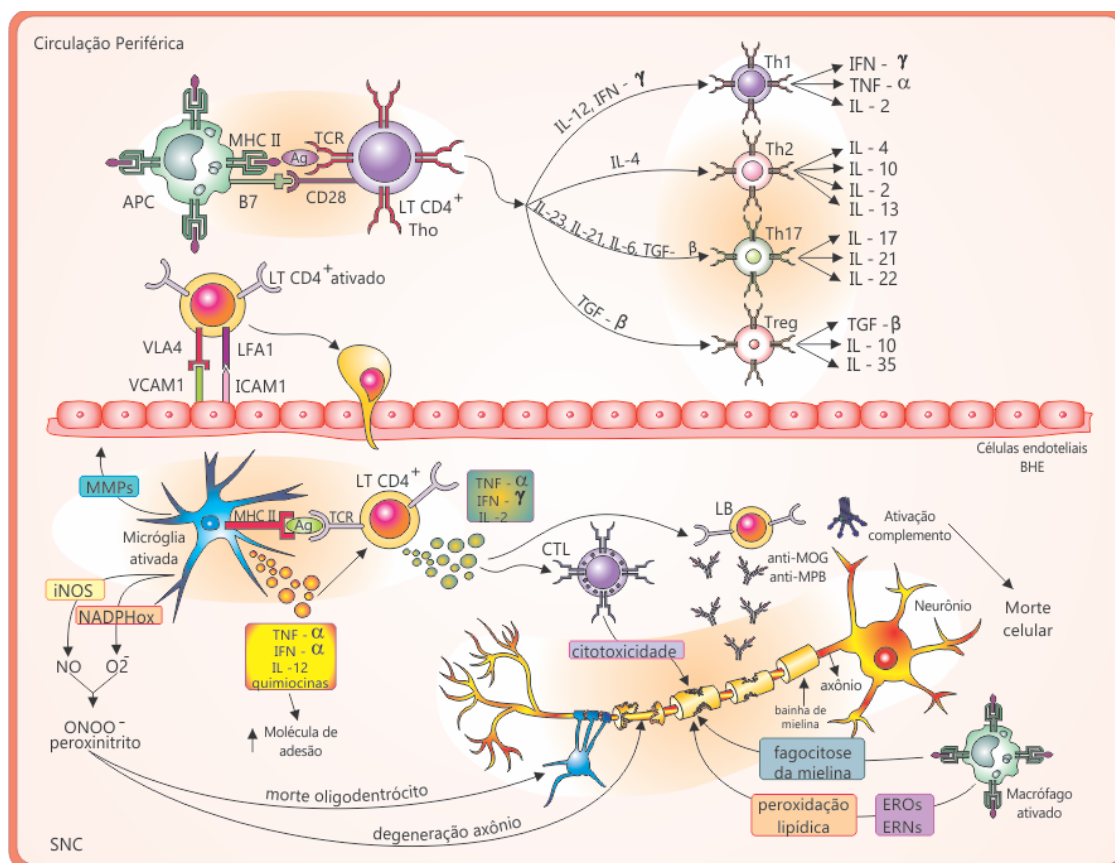
apresentação de antígenos e migração e adesão de leucócitos (ORTIZ et al., 2016). O papel do NO na EM é complexo e também tem sido investigado; no entanto, resultados conflitantes têm sido obtidos. Alguns estudos encontraram aumento dos níveis de metabólitos do NO (NOx) no plasma de pacientes com EM (YAMASHITA et al., 1997; YUCEYAR; TASKIRAN; SAGDUYU, 2001), enquanto outros mostraram diminuição deste marcador (OLIVEIRA et al., 2012). Quando NO é produzido em grande quantidade, rapidamente reage com o ânion superóxido para formar o peroxinitrito, um potente agente oxidante mais tóxico que o NO, capaz de danificar neurônios e oligodendrócitos, e parece ser a molécula chave do estresse oxidativo envolvida na EM (GONSETTE, 2008). Assim, a formação de nitrotirosina (marcador do dano causado pelo peroxinitrito) é frequentemente observada em doenças inflamatórias crônicas. Evidências indicam que níveis de nitrotirosina estão elevados no plasma de pacientes com EM quando comparado a indivíduos saudáveis. A concentração plasmática de nitrotirosina foi duas vezes maior em pacientes com EMSP quando comparados a pacientes com EMRR, sugerindo uma relação deste biomarcador com a progressão da doença (MILLER et al., 2012a).

Por outro lado, estudos relataram redução da capacidade antioxidante total no plasma em pacientes com EM (BESLER; COMOGLU, 2003; OLIVEIRA et al., 2012). Em estudos prévios OLIVEIRA et al., (2012), reportaram que pacientes com EM apresentaram diminuição da capacidade antioxidante total do plasma pelo método do *total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP)*. A metodologia do TRAP envolve uma ação cumulativa de todas as moléculas antioxidantes do plasma, incluindo vitamina E, ácido úrico, vitamina C e proteínas como a albumina. Uma diminuição na concentração do TRAP em pacientes com EM pode ocorrer durante o curso clínico da doença como resultado da inflamação crônica que é acompanhada pelo aumento de substâncias oxidantes (OLIVEIRA et al., 2012).

Sendo assim, essas evidências indicam um desequilíbrio redox em pacientes com EM, demonstrado tanto pelo aumento dos níveis séricos dos parâmetros pró-oxidantes como pela diminuição das defesas antioxidantes, quando comparados com indivíduos saudáveis. Neste contexto, podemos sugerir uma correlação entre biomarcadores do estresse oxidativo com a progressão da incapacidade clínica apresentada pelos pacientes, o que pode fornecer informações sobre prognóstico e ser essencial para um melhor entendimento da patogênese da doença. Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo demonstrou uma correlação positiva entre o grau de incapacidade clínica avaliada pelo EDSS e níveis plasmáticos de peroxidação de lipídeos e de proteínas (proteínas carbonílicas) em pacientes com EM (OLIVEIRA et al., 2012). Portanto, nossa hipótese é a de que marcadores do estresse oxidativo (peroxidação lipídica, oxidação proteica e NOx) possam estar associados com a progressão da EM e serem úteis na prática clínica.

A **Figura 2** resume os principais mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos no SNC em pacientes com EM.

Figura 2 Mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos no sistema nervoso central (SNC) em pacientes com esclerose múltipla (EM)



Macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos com epítopos 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 proinflamatórios como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon α (IFN- α), IL-12, quimiocinas, metaloproteinases 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- γ 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 perivasculares 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 contibuem para o processo de desmielinização na EM.

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

1.7.3 Fatores envolvidos na patogênese da EM, incapacidade e formas clínicas

Pacientes com EM apresentam um risco relativo para doença cardiovascular aumentado, o qual varia conforme o comportamento da doença (ROSHANISEFAT et al., 2014; HUBBARD; MOTL; FERNHALL, 2018). Algumas comorbidades, como hipertensão arterial sistêmica (HAS), obesidade, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM), alcoolismo e tabagismo podem aumentar a probabilidade de progressão da EM e, independentemente, interferir na qualidade de vida (OVERS et al., 2012). As comorbidades cardiovasculares estão vinculadas à rápida progressão da incapacidade e ao risco aumentado para o uso de bengala nesses indivíduos (MARRIE; HORWITZ, 2010; MARRIE et al., 2010).

Essas doenças estão associadas ao aumento do declínio cognitivo e à atrofia cerebral, uma vez que ocasionam exacerbação da inflamação periférica e elevação de marcadores inflamatórios, esta última associada ao aumento da atrofia cerebral (ENZINGER et al., 2005; KNOPMAN, 2005). Em um estudo realizado pelo Comitê Norte-Americano de Pesquisa em EM (NARCOMS), foi observada que a presença de uma ou mais comorbidades vasculares, no momento do diagnóstico da doença, estava correlacionada com um menor tempo de incapacidade para andar numa relação dose-resposta. Quando comparada com doentes com EM sem comorbidades vasculares, a presença de uma ou mais doenças vasculares foi associada ao uso de apoio unilateral para caminhada seis anos antes (MARRIE et al., 2011).

A prevalência da HAS na população com EM ultrapassa 10% e aumenta com a idade. Pode estar associada ao elevado índice de massa corpórea (IMC) e ao perfil predominantemente sedentário adotado por esses pacientes devido à incapacidade (HUBBARD; MOTL; FERNHALL, 2018). Uma pesquisa evidenciou que o acúmulo de lesões cerebrais está correlacionado com a disfunção autonômica cardiovascular (SAARI et al., 2004) e outras relataram que o metaborreflexo e o barorreflexo carotídeo estão alterados na EM, afetando o controle da pressão arterial (MARONGIU et al., 2015; HUANG et al., 2016).

A angiotensina II é a principal molécula efetora do sistema renina-angiotensina (SRA) e sua síntese depende da enzima conversora de angiotensina (ECA), a qual é expressa tanto nos tecidos periféricos como no SNC. No cérebro dos mamíferos, estão presentes os componentes fundamentais do SRA, como os receptores de angiotensina II tipo 1 (AT1R) e 2 (AT2R) (ŽIVKOVIĆ et al., 2016). A angiotensina II além de ser vasoconstritora, é um fator proinflamatório envolvido nos aspectos autoimune e inflamatório do processo de desmielinização. Em um estudo realizado por pesquisadores no Japão, foi observada que a concentração de angiotensina II no LCR tendeu a ter uma correlação negativa com a incapacidade (EDSS) durante surtos da EM, sugerindo que níveis intratecais reduzidos de angiotensina II possam estar relacionados com a lesão neural e com os processos de regeneração na doença (KAWAJIRI et al., 2008).

Os mecanismos pelos quais o tabagismo influencia o risco para EM ainda permanecem obscuros. Sabe-se que é um fator de risco independente para o desenvolvimento da doença, com risco relativo de aproximadamente 1,5 (WINGERCHUK, 2012). Sugere-se que o tabagismo desencadeie uma resposta imune pulmonar que, junto à susceptibilidade genética e a exposição a vírus específicos, leve ao desenvolvimento da EM (OVERS et al., 2012). Tem sido associado ao curso progressivo da doença, gerando aumento da incapacidade, do volume das lesões e da atrofia cerebral (PITTAS et al., 2009; ZIVADINOV et al., 2009). Tem sido relatado que o tabagismo exerce, também, efeitos epigenéticos associados a mecanismos inflamatórios e autoimunes na EM (KÜÇÜKALI et al., 2015).

1.7.4 Alterações metabólicas associadas à incapacidade e formas clínicas da EM

A obesidade é estabelecida como um fator de risco para várias doenças autoimunes (HARPSØE et al., 2014; RICHTER et al., 2017). Alguns estudos correlacionaram a obesidade durante o período da adolescência e do início da idade adulta com o desenvolvimento da EM (KAVAK 2015; HEDSTRÖM; OLSSON; ALFREDSSON, 2016). Há evidências de que a obesidade interage com fatores ambientais e genéticos, aumentando a susceptibilidade ao desenvolvimento da EM. O “estado proinflamatório” da obesidade é caracterizado pelos níveis elevados de citocinas proinflamatórias, como a IL-6 e a leptina, a indução da resposta inflamatória mediada por Th17; além disto, os baixos níveis de metabólitos da vitamina D circulantes em indivíduos obesos são hipóteses para a associação entre obesidade e EM (GIANFRANCESCO; BARCELLOS, 2016).

Uma pesquisa desenvolvida em 2017 concluiu que o IMC apresenta uma repercussão diferente na gravidade da EM entre homens e mulheres. Foi constatada uma correlação modesta entre a obesidade e gravidade da doença nas mulheres (RICHTER et al., 2017). Uma explicação possível para a associação entre maior gravidade da doença com IMC maior é a da

“causalidade reversa”: pacientes com maior incapacidade mantêm menos uma rotina alimentar e de exercícios adequada. Além disso, utilizam mais esteróides e outras medicações associadas ao ganho ponderal (BOVE et al., 2016).

Estudos discutem o efeito paradoxal da obesidade no prognóstico de doenças infecciosas e autoimunes. Embora o IMC mais elevado durante a adolescência e a idade adulta jovem tenham sido relatados como fatores de risco para EM, os dados são conflitantes em relação à associação entre o IMC e a gravidade da doença na EM. Um estudo transversal descobriu que o IMC teve uma modesta correlação com a gravidade da EM e sintomas em mulheres (RICHTER et al., 2017). Por outro lado, um grande estudo mostrou que a obesidade estava correlacionada com pior incapacidade em mulheres, mas não em homens (BOVE et al., 2016). O déficit neuroimune na esquizofrenia foi fortemente previsto por um IMC reduzido, sugerindo que o IMC seria um fator de proteção na faixa de IMC de 25-30 kg/m² (KANCHANATWAN et al., 2018).

O tecido adiposo é uma importante fonte de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias; portanto, pode ter efeitos prejudiciais e protetores, respectivamente. A relação entre IMC e taxa de mortalidade resulta em uma curva em forma de J, que mostra que tanto o IMC alto quanto o IMC muito baixo estão associados ao aumento da mortalidade (GOYAL; NIMMAKAYALA; ZONSZEIN, 2014). Embora o IMC seja um indicador da adiposidade corporal total, ele não reflete a capacidade adiposa de mudar para um estado anti-inflamatório através da adiponectina, uma das adipocinas que pode modular a resposta inflamatória (CORRALES-MEDINA et al. 2011; GOYAL; NIMMAKAYALA; ZONSZEIN, 2014).

O colesterol é um componente essencial da mielina. Os lipídeos, principalmente as lipoproteínas, estão envolvidos na regulação de funções neurais no SNC que estão ligadas ao metabolismo lipídico (WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2011). A dislipidemia pode potencializar processos inflamatórios que ocorrem no endotélio vascular, induzindo à adesão de moléculas e o recrutamento de monócitos (SITIA et al., 2010). Pouco se sabe sobre o efeito dos níveis de triglicerídeos e colesterol, bem como da lipoproteína de alta densidade (HDL) e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) na progressão da EM. Há hipóteses de que os processos pró-inflamatórios e trombogênicos associados à dislipidemia contribuam para a progressão da EM por diversos mecanismos que ocorrem no endotélio vascular da BHE, como o recrutamento de leucócito, aumento da disfunção endotelial e do risco de hipoperfusão (WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2011). Em 2002 um estudo observou que o colesterol total elevado estava associado ao aumento no número de lesões realçadas pelo contraste na RNM encefálica de pacientes com CIS em seguimento após um primeiro evento clínico (GIUBILEI et al., 2002). Foi observado também que pacientes com EM apresentavam mais hipercolesterolemia e que a paraoxonase-1, uma enzima antioxidante associada ao HDL, estava diminuída durante os surtos da doença (JAMROZ-WISNIEWSKA et al., 2009).

O aumento da incidência global da DM é uma preocupação crescente e o número de adultos diabéticos mais que duplicou em três décadas (DANAIEI et al., 2011). Sabe-se que uma disfunção autoimune está envolvida no surgimento da DM (DE SOUZA et al., 2005), assim como vários mecanismos autoimunes estão implicados na fisiopatologia da EM. O impacto da DM na incapacidade da EM pode ser de causa direta, por meio da disfunção autoimune, ou indireta, por exemplo, com o surgimento de dor neuropática e do acometimento visual. A resistência insulínica parece também exacerbar o acometimento cognitivo da EM (WATSON; CRAFT, 2006). Além disso, DM eleva a susceptibilidade ao estresse oxidativo, alterando a função e a estrutura dos vasos sanguíneos, intensificando a resposta inflamatória no cérebro (JEFFERSON et al., 2007).

Processos inflamatórios crônicos, por meio da mediação de citocinas, ocasionam mudanças na resistência insulínica. Pesquisadores brasileiros encontraram uma prevalência maior de resistência insulínica em pacientes com EM quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, os pacientes com EM apresentaram 2,48 vezes mais chance de desenvolver resistência insulínica (OLIVEIRA et al., 2014).

A síndrome metabólica (SM) é uma condição complexa caracterizada por um conjunto de fatores de risco cardiovascular usualmente relacionados à deposição central de gordura e à resistência à insulina. Representa a combinação de pelo menos três componentes dos seguintes: obesidade abdominal por meio de circunferência abdominal em homens ≥ 90 cm e em mulheres ≥ 80 cm, triglicérides ≥ 150 mg/dL, HDL colesterol em homens < 40 mg/dL e em mulheres < 50 mg/dL, pressão arterial sistólica ≥ 130 mmHg ou diastólica ≥ 85 mmHg e glicemia de jejum ≥ 100 mg/dL (ALBERTI et al., 2009). Um estudo prévio constatou que nos indivíduos com doenças autoimunes como artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistêmico, a prevalência da SM é maior do que a média nacional (VERSINI et al., 2014). Uma pesquisa israelense encontrou que 30% de 130 pacientes com EM com incapacidade apresentavam SM (PINHAS-HAMIEL et al., 2015). No entanto, em pacientes com EM os dados sobre SM ainda são limitados (WENS et al., 2013).

O folato, ácido fólico ou vitamina B9 apresenta papel fundamental no SNC, principalmente na conversão da homocisteína (Hcy) em metionina por meio da metionina sintase. A Hcy é um aminoácido não essencial sulfurado, sendo considerada um marcador inflamatório capaz de induzir a ruptura da BHE (KAMATH et al., 2006; MOGHADDASI et al., 2013). Níveis elevados de homocisteína estão associados ao desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas, como a EM e a doença de Alzheimer (TEUNISSEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2018). Acredita-se que os níveis plasmáticos elevados de homocisteína contribuam para a progressão da EM pelo aumento da produção das EROs (FARACI; LENTZ, 2004), da excitotoxicidade pela estimulação dos receptores N-metil-D-metil-aspartato (NMDA), lesão do DNA de neurônios e estímulo à apoptose (HO et al., 2002).

1.7.5 Alterações hormonais associadas à incapacidade e formas clínicas da EM

A assimetria da ocorrência de doenças autoimunes entre os sexos representa um grande desafio para a ciência. Os sistemas imunológico e neuroendócrino estão intimamente conectados e os hormônios sexuais como estrógenos, progesterona, prolactina e testosterona, parecem ter um papel crucial nesse aspecto da autoimunidade (BORBA; ZANDMAN-GODDARD; SHOENFELD, 2018). Condições fisiológicas relacionadas com alterações hormonais na mulher, tais como puberdade, gestação, puerpério e menopausa também exercem significativa influência na prevalência e na evolução da EM (YSRRAELIT; CORREALE, 2019).

A prolactina é um hormônio peptídeo de 23 kDa secretado pela glândula hipófise sob controle do hipotálamo, mas também pode ser produzido em locais extra-pituitários, como ovário, decídua, próstata, glândula mamária, tecido adiposo, cérebro e células imunes, principalmente linfócitos (WALTON; CRONIN, 1990; HEESSEN et al., 2002; MAJUMDAR; MANGAL, 2013; CORREALE; FAREZ; YSRRAELIT, 2014). No entanto, a prolactina extrapituitária tem peso molecular e atividade biológica diferentes (SINHA, 1995). O receptor de prolactina (PRLR) pertence à super família do hormônio do crescimento (GH) e citocinas, que inclui receptores para GH, leptina, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, eritropoietina e fator de inibição da leucemia (SAVINO, 2017). O controle hipotalâmico da secreção de prolactina é diferente de outros hormônios hipofisários anteriores, sendo predominantemente inibitório, por meio da dopamina dos neurônios dopaminérgicos tuberoinfundibulares. Além disso, a prolactina não possui um tecido alvo endócrino e, portanto, não possui o caminho de retrocontrole clássico para regular sua secreção. Em vez disso, é regulada por um retrocontrole de alça curta, em que a prolactina em si atua no cérebro para estimular a produção de dopamina e, assim, inibir sua própria secreção (GRATTAN, 2015). Sua secreção é estimulada por citocinas como a IL-1, IL-2, e IL-6, e inibida pela endotelina-3 e o IFN- γ (DEVI; HALPERIN, 2014).

A hiperprolactinemia é definida como níveis de prolactina acima de 20 ng/mL em homens e 25 ng/mL em mulheres (MAJUMDAR; MANGAL, 2013) com uma taxa esperada de até 3% entre a população saudável. Os níveis aumentam fisiologicamente durante a lactação, mas também como resultado de várias doenças, incluindo prolactinoma, hipotireoidismo e insuficiência adrenal e tem sido associada a múltiplas doenças autoimunes (BUSKILA; SUKENIK; SHOENFELD, 1991; SAVINO, 2017).

A ligação entre a autoimunidade e a prolactina parece ter uma origem genética, uma vez que os genes *prolactina* (*PRL*) e *receptor da prolactina* (*PRLR*) se localizam no braço curto do cromossomo 6, próximo à região MHC classe II, especificamente do *locus* HLA-DRB1,

conhecido, também, por sua associação com doenças autoimunes (MELLAI et al., 2003; VIATTE et al., 2016). A prolactina atua nas respostas imunes inata e adaptativa, participando da maturação de timócitos CD4⁻ CD8⁻ em células T CD4⁺ CD8⁺, por meio da expressão do receptor de IL-2 (VERA-LASTRA; JARA; ESPINOZA, 2002). A hiperprolactinemia afeta a deleção clonal das células B, muda a produção de citocinas Th1 e Th2, ocasionando a secreção de IL-6, IFN- γ , aumenta ainda a produção de imunoglobulinas (TOMIO et al., 2008).

Alguns estudos correlacionaram a hiperprolactinemia positivamente com o início da EM, com os surtos e o número de células secretoras do anticorpo contra a glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (anti-MOG) (COSTANZA et al., 2015; COSTANZA; PEDOTTI, 2016). Em um estudo realizado na Turquia, foi constatado que os grupos de pacientes com EM, CIS e neuromielite óptica (NMO) apresentavam níveis séricos de prolactina maiores do que o indivíduos saudáveis. Além disso, nos grupos de pacientes com EM e NMO, os níveis eram maiores durante o período de surto do que na remissão, e naqueles que apresentaram episódios de mielite (TÜRKOĞLU et al., 2016).

Além dos níveis séricos deficientes de vitamina D, outros parâmetros laboratoriais do metabolismo de cálcio-fósforo, como a concentração sérica do paratormônio (PTH), têm sido descritos em pacientes com EM. Em um estudo realizado na Polônia, pesquisadores observaram níveis séricos mais elevados de PTH em homens em estágio avançado da EM do que em mulheres e o aumento da concentração do PTH ocorreu, também, com o aumento do número de surtos (KUBICKA-BACZYK, et al., 2015). No entanto, outro estudo revelou níveis diminuídos de PTH e da relação sérica de 1,25(OH)D/25(OH)D e aumentados de fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF23) em pacientes com EMRR comparados aos controles, revelando um desequilíbrio do eixo PTH-FGF23-vitamina D na EMRR, que seria consistente com a hipótese do estudo de que na EMRR existe supressão das glândulas paratireoides por concentrações plasmáticas inapropriadamente altas de FGF23 intacto (STEIN et al., 2018).

1.8 TRATAMENTO

O tratamento da EM pode ser dividido em três categorias: sintomático, da fase aguda e modificador da doença.

1.8.1 Sintomático

O tratamento sintomático é composto de medicações que melhoram a qualidade de vida dos pacientes. São medicamentos utilizados principalmente para fadiga, depressão, espasticidade, tremor, disfunções sexual, urinária e intestinal (MARQUES, 2018).

1.8.2 Fase aguda

Durante os surtos, a fase aguda da doença, os glicocorticóides continuam sendo os fármacos mais usados no tratamento da EM, principalmente altas doses de metilprednisolona intravenosa por 3 a 5 dias (MOREIRA et al., 2002; MARQUES, 2018). Porém, aproximadamente 50% dos pacientes não se recuperam satisfatoriamente após surtos graves com o uso de glicocorticóides (NOSEWORTHY; CONFAVREUX; COMPSTON, 2006).

A plasmaférese pode ser usada para o tratamento de pacientes com EM em surtos graves que apresentaram resposta insatisfatória ao uso de glicocorticóides ou também quando aplicações repetidas de altas doses de glicocorticóides não resultam em uma recuperação significativa para os doentes. No entanto, apesar de um grupo de pacientes responder à plasmaférese, esse tratamento parece não ser apropriado para todos os pacientes com EM, não sendo indicado de rotina para os surtos da EM (KEEGAN et al., 2005).

Uma metanálise evidenciou que a imunoglobulina intravenosa é efetiva na prevenção de surtos de pacientes com EM recorrente (GRAY; MCDONNELL; FORBES, 2003).

1.8.3 Modificador da doença

Os interferons (IFNs) são proteínas que participam naturalmente da resposta imune e têm as funções de atrair, modificar e dirigir as células do sistema imune para suas ações (PLOSKER, 2011). Na EM são usados dois tipos de IFN- β , “a” e “b”, os quais são produzidos por recombinação genética a partir do gene humano, diferindo pela forma de produção, sendo o tipo “a” em ovário de *hamster* e o tipo “b” em cultura de *Escherichia coli* (MARQUES et al., 2018).

O acetato de glatirâmer é um polipeptídeo sintético com uma formação randomizada de quatro aminoácidos. Seu mecanismo de ação é o desvio da reação autoimune contra a proteína de mielina básica, cujo fragmento 83-99 é mimetizado pelo polipeptídeo sintético. Além disso, parece induzir a tolerância e desvio da resposta imune para perfil Th2 (JOHNSON et al., 1995).

A EM foi a primeira doença neurológica a receber aprovação para tratamento com um anticorpo monoclonal, cuja eficácia foi comprovada pela redução da taxa de surtos, do número de novas lesões, da incapacidade e do grau de atrofia cerebral. Entre os anticorpos monoclonais, há o natalizumabe e o alentuzumabe, ambos aprovados para uso na doença. O rituximabe, indicado oficialmente para tratamento de linfoma de células B, tem sido utilizado de forma *off-label* na EM (MARQUES et al., 2018).

O natalizumabe é um antagonista da integrina $\alpha 4$ (subunidades $\beta 1$ e $\beta 7$), molécula expressa na superfície dos leucócitos, apresentando um papel essencial na migração dessas células para o SNC através da barreira hematoencefálica. Quando se liga à integrina $\alpha 4$, o natalizumabe impede sua interação com a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), impossibilitando a adesão e a migração de leucócitos ativados ao SNC (KAPPOS et al., 2007; COYLE et al., 2009). É indicado no tratamento de pacientes com EMRR com intensa atividade da doença (MARQUES et al., 2018).

O alentuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado, contra a molécula CD52, expresso na superfície de linfócitos T e B maduros, cuja função ainda não foi bem estabelecida. O bloqueio dessa molécula leva à eliminação rápida e prolongada de linfócitos maduros (COLES, 2013; FREEDMAN; KAPLAN; MARKOVIC-PLESE, 2013; GARNOCK-JONES, 2014). Mostrou eficácia na redução da atividade da doença em pacientes com EMRR sem história de tratamento prévio e naqueles com falha terapêutica ao IFN- β e ao acetato de glatirâmer (COLES et al., 2012).

O desenvolvimento de novos tratamentos para a EM resultaram no lançamento de novos fármacos, inclusive por via oral. Dentre eles, destacam-se o fingolimode, a teriflunomida e o fumarato de dimetila (MARQUES et al., 2018).

O fingolimode foi aprovado como primeira linha de tratamento para pacientes com EMRR e é um pró-fármaco fosforilado *in vivo* pela enzima esfingosina quinase-2 a um composto biologicamente ativo, o fingolimode-fosfato. A forma fosforilada é um análogo estrutural da esfingosina-1-fosfato (S1P), a qual atua como lipídio sinalizador agonista em pelo menos quatro dos cinco receptores S1P (S1P1, S1P3, S1P4 e S1P5) acoplados à proteína G em múltiplos processos biológicos no organismo, incluindo a neuroinflamação e a migração de linfócitos dos tecidos linfóides para a circulação sistêmica (KIM et al., 2015).

A teriflunomida é um inibidor não competitivo e reversível da enzima mitocondrial desidrogenase di-hidro-otato (DHODH). O *pool* celular do nucleotídeo pirimidina é derivado

de uma via de salvamento independente da DHODH, ou, em situações em que é necessária uma grande proliferação celular, de uma via de síntese “de novo”, dependente dessa enzima. Ela age apenas em células como os linfócitos em grande proliferação, e não em células em repouso ou em expansão homeostática, atuando, portanto, apenas em situações em que a função celular esteja hiper-reativa, sem impedir o metabolismo homeostático básico. Inibe a atividade da proteína tirosina-quinase, reduzindo a proliferação de células T, a ativação e a produção de citocinas, em especial IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (O’CONNOR et al., 2006; WARNKE et al., 2009; CLAUSSEN; KORN, 2012; MILLER et al., 2012b). Interfere na interação entre os linfócitos T e as células apresentadoras de antígenos, bloqueia o TNF- α , induz a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) e inibe moléculas de adesão celular e metaloproteinases (FRAGOSO; BROOKS, 2015).

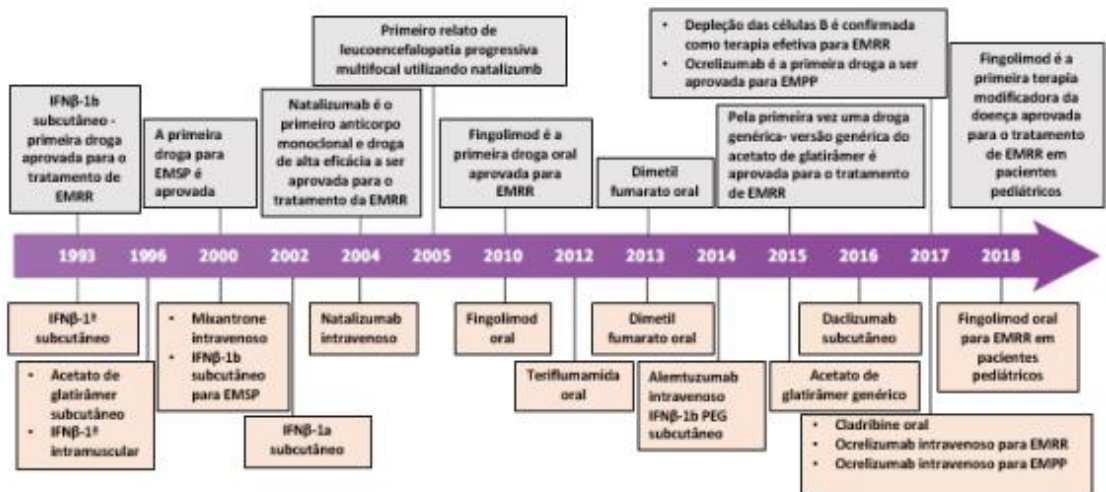
O fumarato de dimetila apresenta atividade anti-inflamatória, tanto por sua ação linfocitária quanto pela ação sobre a migração celular. Ocorre redução nos leucócitos circulantes e inversão da resposta de Th1 para Th2, por meio da elevação das IL-4, IL-5 e IL-10, assim como redução na regulação das moléculas-1 de adesão intracelular, vascular e selectina-E, dificultando a passagem de linfócitos T ativados pela barreira hematoencefálica. Além disso, o fumarato de dimetila ativa a via de transcrição Nrf2, sinalizando que esse medicamento tem ação sobre o estresse oxidativo, exercendo dessa forma, um efeito neuroprotetor (BURNES; DEEKS, 2014; BOMPRESZI, 2015; SHEREMATA; BROWN; RAMMOHAN, 2015).

O transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas é uma imunointervenção com o objetivo de reduzir a atividade do sistema imunológico por meio da imunossupressão e resgate do sistema com repopulação da medula através da infusão das células-tronco. Alguns estudos demonstraram que de 500 pacientes com EM submetidos ao transplante, 46% encontram-se sem progressão clínica da doença quando avaliadas a presença de surtos e a escala EDSS, depois de cinco anos de seguimento, havendo uma taxa de sobrevivência de 92% nesse grupo (SNOWDEN et al., 2012).

Recentemente, o ocrelizumab, um anticorpo monoclonal anti-CD20 foi aprovado tanto para o tratamento da EMRR quanto da EMPP (FRAU et al., 2018; MARQUES et al., 2018).

A **Figura 3** ilustra a linha do tempo do desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da EM.

Figura 3 Linha do tempo do desenvolvimento de medicamentos utilizados no tratamento da EM. Importantes marcos do desenvolvimento são mostrados nos quadros de cor cinza e drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (Estados Unidos) ou Agência Europeia de Medicina para o tratamento de EM secundária progressiva são mostradas nos quadros de cor rosa.



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

2 JUSTIFICATIVA

A EM se caracteriza pela grande heterogeneidade quanto ao quadro clínico, índices de progressão da incapacidade, formas clínicas e respostas às terapias clássicas recomendadas para o tratamento destes pacientes. Esta heterogeneidade é forte evidência de que existem vários mecanismos lesivos envolvidos na sua fisiopatologia, como os mediados pela desregulação da resposta imunológica inata e adaptativa, mecanismos do estresse oxidativo e nitrosativo e alterações de importantes vias metabólicas e hormonais, como a dos carboidratos, homocisteína, ácido fólico, PTH, cálcio, vitamina D e obesidade.

Diante desta heterogeneidade de mecanismos envolvidos, os dados clínicos e os obtidos por exames de imagem, como a RNM, podem ser insuficientes para um diagnóstico e avaliação do prognóstico mais precocemente e com maior sensibilidade e especificidade. Diante disto, a busca por biomarcadores em EM tem sido um campo muito ativo de pesquisa, relevante para contribuir para o diagnóstico, avaliação do prognóstico e melhorar o novo paradigma da medicina personalizada (AUFFRAY; CHARRON; HOOD, 2010; HOOD; FRIEND, 2011).

A identificação de um biomarcador preditivo de progressão da EM, particularmente quando medido no início do processo da doença, pode ter um impacto enorme na tomada de decisão dos médicos que tratam pacientes com EM (GOURRAUD et al., 2012). No entanto, a maioria dos estudos com biomarcadores não foi validada e, portanto, não são clinicamente úteis no momento. Além disso, estudos que avaliam as vias da inflamação, metabólicas e do estresse oxidativo durante o acompanhamento clínico, laboratorial e de tratamento de pacientes com EM em diferentes formas clínicas são escassos e alguns resultados são conflitantes.

Não há até o presente momento estudos que tenham avaliado o comportamento destes biomarcadores durante o seguimento clínico de pacientes com EM.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os marcadores inflamatórios, metabólicos, hormonais e de estresse oxidativo e nitrosativo (IMO&NS) em pacientes com EM por um período de 16 meses.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis plasmáticos de marcadores hormonais e IMO&NS em pacientes com EM durante 16 meses de acompanhamento ambulatorial;
- Avaliar se há associação entre os marcadores hormonais e IMO&NS em pacientes com EM e a incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas da doença, durante 16 meses de acompanhamento ambulatorial;
- Identificar marcadores hormonais e IMO&NS que possam ser utilizados como preditores da incapacidade, progressão da incapacidade e formas clínicas da doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

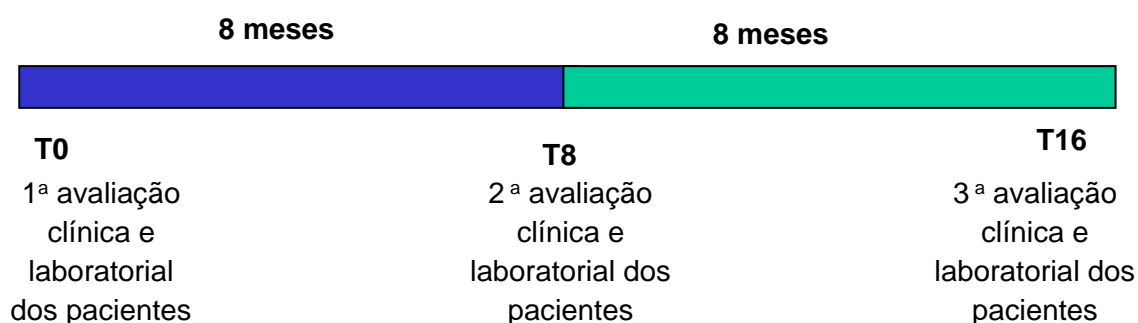
O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade de Londrina, Paraná, Brasil (CAAE: 22290913.9.0000.5231) e todos os indivíduos convidados foram informados detalhadamente sobre a pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Apêndice 2).

O estudo também foi aprovado pela Novartis Biosciences S.A., quando foi proposto como um Estudo de Iniciativa do Investigador, recebendo o registro CFTY720DBR07T.

4.2 DELINEAMENTO

O estudo apresenta um desenho observacional, longitudinal e prospectivo. Os pacientes foram diagnosticados com EM de acordo com os critérios de McDonald (POLMAN et al., 2011). A incapacidade dos pacientes foi avaliada usando a escala EDSS de acordo com Kurtzke (1983). Os pacientes com EM incluídos no estudo foram acompanhados por um período de 16 meses (Figura 3).

Figura 3 Delineamento do estudo proposto para avaliar marcadores do estresse oxidativo e inflamatórios em pacientes com esclerose múltipla (EM) em um período de 16 meses, sendo no momento de inclusão no estudo ou *baseline* (T0), após 8 meses (T8) e após 16 meses (T16) de seguimento ambulatorial



T0: tempo de inclusão dos pacientes no estudo; T8: após 8 meses da inclusão no estudo; T16: após 16 meses da inclusão no estudo

4.3 PARTICIPANTES DO ESTUDO

Foi realizado um estudo prospectivo com delineamento de metodologia observacional em 140 pacientes elegíveis com EM recrutados no Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) de Londrina, PR, no período de dezembro de 2014 a março de 2017. Foram incluídos indivíduos adultos, ambos os sexos e com diagnóstico de EM de acordo com os Critérios McDonald (POLMAN et al., 2011). Os pacientes com EM foram classificados como EMRR, EMPP e EMSP (LUBLIN et al., 2014) e foram avaliados no momento da inclusão ou *baseline* (T0), após oito meses de seguimento (T8) e após 16 meses de seguimento (T16). Todos os pacientes com EM estavam na fase de remissão clínica, definida como o período de recuperação sem episódios de recaída nos últimos três meses antes do momento da inclusão no estudo. Os pacientes não estavam em uso de corticóides. Todos foram tratados de acordo com as diretrizes para o tratamento da EM (MARQUES, 2018) e o uso de terapias para EM foram registrados em cada avaliação clínica.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão foram pacientes com EM e com diagnóstico de outras doenças autoimunes, inclusive NMO, infecciosas, outras comorbidades, gestação; pacientes que estivessem em uso de qualquer suplemento vitamínico e/ou antioxidante que alterassem os biomarcadores laboratoriais avaliados.

4.5 DADOS DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ANTROPOMÉTRICOS E CLÍNICOS

Na visita T0 (*baseline*), os dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos foram coletados por questionário padrão (Apêndice 1). A etnia foi classificada de acordo com a autopercepção do indivíduo da cor da pele como caucasiano e não-caucasiano (BRASIL, 2011). O índice de massa corporal (IMC) expresso em Kg/m², e circunferência abdominal (expressa em cm) também foram registrados; pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD) foram registradas e a média foi usada na análise como descrita em estudo prévio (OLIVEIRA et al., 2018).

A incapacidade foi avaliada em cada avaliação clínica (T0, T8 e T16) com a aplicação da Escala Expandida de Estado de Incapacidade (EDSS), segundo Kurtzke (1983). A progressão da incapacidade foi determinada utilizando a alteração na incapacidade ao longo do tempo, denominado Δ EDSS, obtido com os cálculos do EDSS T8 - EDSS T0, EDSST16 - EDSST8, bem como EDSST16 - EDSS T0. Os valores de Δ EDSS foram expressos como

variáveis de escala ou dicotomizados como ≤ 0 (sem progressão da incapacidade) ou > 0 (com progressão da incapacidade). O período de oito meses entre as avaliações foi considerado adequado para que as variações nos biomarcadores laboratoriais e parâmetros clínicos avaliados pudessem ser observados e mensurados.

4.6 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

4.6.1 Obtenção de amostra

Amostras de sangue venoso foram coletadas após jejum de 12 horas, com ácido etilenodiamionotetracético (EDTA) como anticoagulante e sem anticoagulante no início do estudo (T0) e durante o seguimento (T8 e T16). As amostras foram consecutivamente e anonimamente codificadas e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 min. As alíquotas de plasma e soro foram armazenadas a -80°C até serem analisadas.

4.6.2 Biomarcadores inflamatórios

A proteína C reativa (PCR) foi determinada com ensaio de alta sensibilidade utilizando turbidimetria (Architect C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA) e a ferritina foi determinada com ensaio de quimioluminescência por micropartículas (CMIA) (Architect i2000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA). Os procedimentos técnicos e valores de referência foram os recomendados pelos fabricantes dos reagentes. Os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , IL-4 e IL-10 foram determinados pelo método imunofluorimétrico com imunoensaio de multiplex de microesferas (Novex Life Technologies, Frederick, EUA) para a plataforma Luminex, instrumento MAGPIX® (Luminex Corp., TX, USA). Os protocolos e os valores de referência foram seguidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.6.3 Biomarcadores metabólicos/hormonais

Os biomarcadores metabólicos foram avaliados pela dosagem de glicose, colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicerídeos e cálcio, utilizando um autoanalisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring, 1998). Deerfield, IL, EUA). Os níveis séricos de Hcy, PTH, ácido fólico, insulina, prolactina e 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D] foram determinados por meio de CMIA (Architect, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, EUA). Os protocolos e os valores de referência foram seguidos de acordo com as instruções dos fabricantes

4.6.4 Biomarcadores do estresse oxidativo/nitrosativo

Os biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo avaliados foram os níveis plasmáticos de hidroperóxidos lipídicos determinados por quimioluminescência iniciada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH), como descrito (GONZALEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991). Os resultados foram expressos em contagem por minuto (c.p.m.). A oxidação protéica foi avaliada pelos biomarcadores AOPP e proteínas carbonílicas, como descritos anteriormente (WITKO-SARSAT et al., 1998; REZNIK; PACKER, 1994, respectivamente). O conteúdo carbonílico nas proteínas foi determinado no plasma por espectrofotometria baseado na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4dinitrofenilhidrazona e os resultados foram expressos em nmol mL⁻¹ mg⁻¹ proteínas totais (REZNICK; PACKER, 1994). A concentração de óxido nítrico (NO) foi estimada pela mensuração dos metabólitos do NO (NO_x) como nitritos (NO₂⁻) e nitratos (NO₃⁻), utilizando-se esferas de cádmio para a redução de nitrato a nitrito o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM (NAVARRO-GONZÁLVEZ; GARCIA-BENAYAS; ARENAS, 1998; PANIS et al., 2011).

A capacidade antioxidante total do plasma foi determinada pelo método de *Total Radical Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP), como descrito previamente (REPETTO et al., 1996). Brevemente, esta técnica quantifica antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de quimioluminescência. Baseia-se neutralização de radicais livres gerados pela adição de um azoiniciador pelos antioxidantes presentes no plasma a ser testado, período no qual a oxidação é inibida e comparada ao do Trolox® (New Jersey, EUA) análogo hidrossolúvel da vitamina E, usado como antioxidante de referência e quantitativamente relacionado à capacidade antioxidante total do plasma. Os níveis séricos de ácido úrico (AU) foram determinados por autoanalisador bioquímico (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL) e foram usados para corrigir os valores de TRAP. Os valores de TRAP foram expressos em μM Trolox/AU (VENTURINI et al., 2012). O grupamento sulfidril (SH) das proteínas foi determinado no plasma por espectrofotometria (HU, 1994) e os resultados foram expressos em μM.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis contínuas foram expressas como média e \pm desvio padrão (\pm DP) e as variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%). Utilizamos a análise de variância (ANOVA) para avaliar as diferenças intergrupos nas variáveis de escala e a análise das tabelas de contingência (teste X^2) para verificar as associações entre as variáveis ordinais. Empregamos a análise multivariada de modelo linear geral (GLM) para avaliar os efeitos de grupos (grupos EDSS ou EMRR *versus* EMSP + EMPP) como variáveis exploratórias primárias sobre dados de biomarcadores enquanto controlamos variáveis externas (idade, sexo, IMC). Consequentemente, foram realizados testes para efeitos entre sujeitos para examinar os efeitos de variáveis exploratórias significativas sobre as variáveis dependentes. Foram utilizadas análises de Modelo Misto Linear (LMM) para examinar as associações entre mudanças no escore EDSS (de T0 a T8 a T16, medidas repetidas) e os biomarcadores, ajustando-se às variáveis externas relevantes (para isso, inserimos idade, sexo, formas clínicas de EM, tratamentos para EM, IMC, tabagismo e HAS na análise).

A análise de regressão múltipla foi usada para examinar as associações entre T16 EDSS (variável dependente) e biomarcadores selecionados em T0 e T8 ou em T8 e T16, enquanto ajustada para variáveis relevantes estranhas ou confundidoras (para este fim entramos idade, sexo, MS clínico formas, tratamento da EM, IMC, tabagismo e HAS na análise). Empregamos a análise de regressão logística binária para definir os biomarcadores mais significativos que preveem EMSP + EMPP *versus* outros tipos de EM, ajustando os fatores de confusão relevantes (incluindo as variáveis estranhas listadas acima e a etnia autodeclarada, o DM e a duração da doença). Os resultados foram transformados em escores z para comparar escores que são de diferentes distribuições, unidades ou escalas normais. Pontuações compostas ponderadas por unidade z foram computadas incluindo transformação z de cálcio (zCa^{2+}) + z25(OH)D ($zCa^{2+} + z25(OH)D$) refletindo uma desordem combinada em cálcio e vitD; zIL-6 + zIL-17 - zIL-4 ($zIL-6 + zIL-17 - zIL-4$), o que reflete a relação entre as respostas inflamatória e anti-inflamatória, e zHcy – zácido fólico refletindo um índice integrado de toxicidade à homocisteína e menor proteção pelo ácido fólico. Análises de regressão foram verificadas quanto à multicolinearidade. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o Programa IBM SPSS Windows versão 24. Os testes foram bicaudais, e um nível alfa de 0,05 indicou um efeito estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em forma de dois artigos científicos originais, a serem submetidos em periódicos internacionais na área de Neurologia Clínica.

5.1 Artigo 1- Inflammatory and metabolic biomarkers are associated with the clinical forms and disability over time in patients with multiple sclerosis: a follow-up study, a ser submetido ao *Molecular Neurobiology*, com índice de impacto de 5.076

5.2 Artigo 2- Prolactin is not associated with disability and clinical forms in patients with multiple sclerosis, submetido ao *Neuromolecular Medicine*, com índice de impacto de 2,950.

Artigo 1

Inflammatory, hormonal and metabolic biomarkers are associated with the clinical forms and disability over time in patients with multiple sclerosis: a follow-up study

Wildéa Lice de Carvalho Jennings Pereira^{1,2}, Tamires Flauzino¹, Daniela Frizon Alfieri¹, Sayonara Rangel Oliveira^{1,3}, Ana Paula Kallaur¹, Andrea Name Colado Simão^{1,3}, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^{1,3}, Damacio Ramón Kaimen-Maciel^{2,4}, Michael Maes^{5, 6}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,3}

¹Laboratory of Applied Immunology, Health Sciences Center, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

²Outpatient Clinic for Neurology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

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

⁴Clinical Neurology, Santa Casa de Misericórdia de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁵IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia;

⁶Department 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, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br; ORCID: 0000-0001-6507-2839

Abstract

Background: Genetic, environmental factors and changes in immunologic and metabolic pathways play a role in the development and clinical course of multiple sclerosis (MS).

Objective: To evaluate the role of inflammatory, hormonal, metabolic, oxidative and nitrosative stress (IMO&NS) biomarkers on disability, disease progression and clinical forms in MS patients during 16 months follow-up.

Methods: Clinical and laboratory data were obtained from 119 patients with relapsing-remitting MS (RRMS) and 21 with progressive MS (ProgMS) at admission (T0), and eight (T8) and 16 months (T16) later. The Expanded Disability Status Score (EDSS) was applied at T0, T8 and T16 and the progress in the EDSS score (Δ EDSS) was calculated. Values of Δ EDSS, expressed as continuous or dichotomized variable (as ≤ 0 or >0) were used to evaluate the progression of disability.

Results: The study included 140, 128, and 122 MS patients at T0, T8 and T16, respectively. Of them, 47 patients showed accumulating disability, increasing from 3.4 (T0) to 4.5 (T8) and to 5.1 (T16). Δ EDSS scores from T0 to T16 were positively associated with systemic arterial hypertension (SAH), age, high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin (IL)-17 and advanced oxidized protein products (AOPP), and negatively associated with folic acid and calcium. Δ EDSS scores from T8 to T16 were predicted by biomarkers from T0 to T8, namely decreased 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] and folic acid and an increased immune activation index (zIL-6+zIL-17-zIL-4). Moreover, 51.1% of T16 EDSS was explained by SAH, smoking, age, male sex, and zIL-6+zIL-17-zIL-4 at T8 (all positively), T0 25(OH)D and T8 calcium (both negatively). In another model, 40.3% of T16 EDSS was explained by SAH, smoking, age, T16 homocysteine (Hcy) / folic acid ratio, T16 zIL-6+zIL-17-zIL-4 (all positively) and T8 25(OH)D (negatively). Hcy, parathormone (PTH), IL-6, and IL-4 were higher and 25(OH)D was lower among patients with ProgMS than those with RRMS.

Conclusions: A set of IMO&NS biomarkers, together with SAH and age, was strongly associated with changes in disability of MS patients during 16-month follow-up. Dysregulation in the immune response, PTH and Hcy-folic acid metabolisms as well as low levels of 25(OH)D and calcium play a role in the progression of MS and its clinical forms. These biomarkers may prove useful as possible laboratory biomarkers to predict accumulating disability over time in MS patients.

Keywords: multiple sclerosis; inflammation; disability; homocysteine; folic acid; vitamin D

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune-mediated disabling disease of the central nervous system (CNS) (Sicras-Mainar et al. 2017), affecting approximately 2.5 million individuals worldwide (Files et al. 2015). It is a complex disease, most frequently observed among young adults, females and Caucasians (Türkoğlu et al. 2016). The etiology of MS is not fully understood, but accumulating evidence suggests that the risk of MS, as well as the clinical course and disease progression, are determined by interactions between a complex genetic background, breakdown in immune tolerance against myelin and neuronal antigens, dysregulation of the immune response, and dysfunction of the blood brain-barrier (BBB) (Gourraud et al. 2012; Beecham et al. 2013; Olsson et al. 2017; Kallaur et al. 2017a). Moreover, several environmental risk factors for MS, such as vitamin D deficiency, smoking, Epstein–Barr virus (EBV) infection, as well dietary-intake are all known to exert epigenetic effects (Swank and Dugan 1990; Ramagopalan et al. 2010; Küçükali et al., 2015).

The presence of comorbidities, such as systemic arterial hypertension (SAH), type 2 diabetes mellitus (DM), and obstructive lung disease, but not hyperlipidemia showed an independent and cumulative impact on clinical disability measures (Conway et al. 2017). The presence of SAH and heart disease contributed to advanced brain atrophy in MS patients over 5-year follow-up period (Jakimovski et al. 2018). Moreover, obesity, metabolic syndrome (MetS) and tobacco smoking are associated with a delay in MS diagnosis and with the disability of MS patients (Overs et al. 2012).

Different pathological mechanisms are involved in MS, including autoimmune inflammation, demyelination, neurodegeneration with axonal and neuronal death, astrogliosis, and metabolic alterations that are most likely responsible for the disease heterogeneity (Sospedra and Martin 2016). The innate immune system contributes to axonal loss in MS lesions through infiltrated macrophages. These cells produce mediators, such as pro-inflammatory cytokines (IL-

1, IL-12, TNF- α), free radicals, glutamate and metalloproteases that exert effects on axonal integrity (Hendriks et al., 2005). The adaptive immune response in MS is characterized by the expression of Th1, Th2 and Th17 cytokines, as well as chemokines and their receptors (Mikulkova et al. 2011). While the demyelination and neurodegeneration occurring in MS are driven by Th1 and Th17 adaptive immune responses associated with disease initiation, Th2 and T regulatory (Treg) cells secreting anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10, respectively) are reported to be protective in MS (Kallaur et al. 2013).

The CNS is highly susceptible to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) and proteins, lipids and DNA of the CNS tissue are target of the oxidative and nitrosative stress initiating inflammatory processes, which contribute to myelin and oligodendroglia destruction. These damage mechanisms also sustain the neurodegeneration in the chronic phase of disease (Ferretti et al. 2005; Adamczyk; Adamczyk-Sowa 2016; Ohl et al. 2016).

The search for biomarkers in MS has been a very active field of research that is relevant to the new paradigm of personalized medicine (Auffray et al., 2010; Hood and Friend 2011). Ferritin, albumin, lipid hydroperoxides, advanced oxidized protein products (AOPP), total antioxidant plasma capacity and nitric oxide metabolites (NOx) were suggested to be predictors of MS diagnosis, whereas albumin and AOPP were suggested to be predictors that differentiated relapsing-remitting MS (RRMS) from the progressive clinical forms of MS (ProgMS) (Oliveira et al. 2017a). Dysregulation of the concentration of molecules involved in different pathways, such as vitamin D (Oliveira et al.2017b), homocysteine (Hcy) (Oliveira et al., 2018) and folic acid has been associated with MS (Kocer et al. 2009; Moghaddasi et al. 2013). Higher levels of Hcy were reported in MS patients than controls (Oliveira et al. 2018; Moghaddasi et al. 2013; Ramsaransing et al. 2006), and were associated with high disability scores (Guzel et al. 2016). However, other studies showed contradictory results (Río et al. 1994; Kararizou et al. 2013;

Teunissen et al. 2008). Moreover, the evaluation of IMO&NS biomarkers during clinical, laboratory and treatment follow-up of patients with MS in different clinical forms are scarce. Hence, the aims of the present study were to delineate the associations between IMO&NS biomarkers and clinical MS forms, disability and disease progression during a 16 months-follow-up.

Materials and Methods

Study subjects and clinical characteristics

A prospective study was carried out with an observational methodology design in 140 eligible patients with MS enrolled from the Specialized Outpatient of University Hospital (AEHU) of Londrina, Southern Brazil, from December 2014 to March 2017. Adult individuals were included, both sexes, and with MS diagnosis according to the McDonald Criteria (Polman et al. 2011). The MS patients were classified as RRMS, primary progressive MS (PPMS) and secondary progressive MS (SPMS) (Lublin et al., 2014). The patients were evaluated at the time of the inclusion or baseline (T0), eight month-follow-up (T8), and 16 month-follow-up (T16). 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 study enrollment. All of them were treated according to the MS treatment guideline (Comini-Frota et al. 2017; Marques et al., 2018) and the use of MS therapies was recorded in each clinical evaluation.

Exclusion criteria were MS patients with diagnosis of other autoimmune, infectious diseases, other comorbidity and treatment with any vitamin and/or antioxidant supplement that alter the laboratory biomarkers that were evaluated. The disability was evaluated in each clinical evaluation (T0, T8 and T16) using the Expanded Disability Scale Status (EDSS, Kurtzke 1983). Progression in disability was determined using the change in the disability over time, namely Δ EDSS, that was obtained with EDSS T8 - EDSS T0, EDSST16 - EDSST8, as well as

EDSST16 - EDSS T0. Δ EDSS values were expressed either as continuous or dichotomized variables; Δ EDSS ≤ 0 was defined as no disability progression and Δ EDSS > 0 was defined as disability progression.

At the T0 visit (baseline), demographic, epidemiological, anthropometric and clinical data were taken by standard questionnaire. The ethnicity was classified according to individual's self-perception of skin color as Caucasian and non-Caucasian (Brazil 2011). Body mass index (BMI) and waist circumference were also recorded; systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured and the mean of these measurements was used in the analysis as described elsewhere (Oliveira et al., 2018). Moreover, use of antihypertensive medication was an indication of systemic arterial hypertension (SAH) (James et al. 2014). DM was defined as a fasting serum glucose ≥ 126 mg/dL, a non-fasting serum glucose ≥ 200 mg/dL and/or use of hypoglycemic medication (American Diabetes Association 2014). Dyslipidemia and MetS were defined as previously reported (National Cholesterol Education Program Expert Panel On Detection, Evaluation 2002; Grundy et al. 2005, respectively).

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 samples and IMO&NS biomarkers

Venous blood samples were drawn after fasting for 12 hours, with and without anticoagulants at baseline (T0) and during the follow-up T8 and T16. 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° C until used. The inflammatory biomarkers were evaluated through C-reactive protein, determined with high sensitivity assay (hsCRP) using

turbidimetry (Architect C8000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), ferritin, determined with chemiluminescent microparticle assay (CMIA) (Architect i2000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) and plasma levels of cytokines IL-2, IL-6, IL-17, IFN- γ , IL-4, and IL-10, determined using immunofluorimetric method with microspheres multiplex immunoassay (Novex Life Technologies, Frederick, USA) for Luminex platform in MAGPIX® instrument (Luminex Corp., TX, USA). Metabolic biomarkers were evaluated through glucose, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglycerides, and calcium using a biochemical autoanalyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA); Hcy, PTH, folic acid, and 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] serum levels were determined using CMIA (Architect i2000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA).

The oxidative and nitrosative stress was evaluated using plasma levels of lipid hydroperoxides determined by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescent (CL-LOOH), as described (Gonzales-Flecha et al. 1991); AOPP and protein carbonyl were determined as previously described (Witko-Sarsat et al. 1998; Reznik; Packer 1994, respectively); nitric oxide (NO) concentration was estimated by measuring the metabolites nitrites (NO²⁻) and nitrates (NO³⁻) using cadmium beads for the reduction of nitrate to nitrite (Navarro-González et al. 1998). Moreover, total plasma antioxidant capacity was evaluated using total radical antioxidant parameter (TRAP), as reported (Repetto et al., 1996). The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX. Serum levels of uric acid (UA) were determined using a biochemical auto analyzer (Dimension Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL) and were used to correct the TRAP values. The TRAP results were expressed by the mM Trolox/UA mg/mL ratio (Venturini et al., 2012). Sulfhydryl group (SH) of proteins was evaluated in plasma by the spectrophotometry method (Hu, 1994) and the results were expressed in μ M.

Statistical Analysis

We used analysis of variance (ANOVA) to assess intergroup differences in scale variables and analysis of contingency tables (X^2 -test) to check associations between ordinal variables. We employed multivariate general linear model (GLM) analysis to assess effects of groups (EDSS groups or RR versus SPMS+PPMS) as primary explanatory variables on biomarker data while controlling for extraneous variables (age, sex, BMI). Consequently, tests for between-subject effects were performed to examine the effects of significant explanatory variables on the dependent variables. Linear Mixed Model (LMM) analysis, repeated measurements, was used to examine the associations between the three EDSS scores (from T0 to T8 to T16) and the biomarkers, while adjusting for the relevant extraneous variables. Toward this end we adjusted the results for time, age, sex, clinical MS forms, MS treatments, BMI, smoking and HAS. We employed a stepwise model selection approach and evaluated the goodness of fit of the different models using the Bayesian information criterion (BIC). We used the autoregressive repeated covariance matrix and the maximum likelihood method. Multiple regression analysis was used to examine the associations between T16 EDSS (dependent variable) and selected biomarkers at T0 and T8 or at T8 and T16, while adjusting for the relevant extraneous variables (toward this end we entered age, sex, clinical MS forms, MS treatments, BMI, smoking and HAS in the analysis). We employed binary logistic regression analysis to define the most significant biomarkers predicting SPMS+PPMS versus other types of MS while adjusting for the relevant confounders (including the extraneous variables listed above and self-declared ethnicity, DM, and duration of illness). Regression analyses were checked for multicollinearity. The results were transformed in z-scores (z) to compare scores that are from different normal distributions, units or scales. Z unit weighted composite scores were computed including z transformation of calcium (zCa^{2+}) + $z25(OH)D$, named as $zCa^{2+}+zvitD$, reflecting a

combined disorder in calcium and vitD; $z(zIL-6+zIL-17) - zIL-4$, named as $zIL-6+zIL-17-zIL-4$, reflecting inflammatory *versus* anti-inflammatory response, and $zHcy - zfoliacid$, named as $zHcy-zfoliacid$, reflecting an integrated index of Hcy toxicity and lowered protection by folic acid). All statistical analyses were performed employing IBM SPSS Windows version 25. Tests were 2-tailed, and an alpha level of 0.05 indicated a statistically significant effect.

Results

Demographic and clinical characteristics of subjects

At T0 (baseline), 140 patients were evaluated, 119 with RRMS, 18 with SPMS and 3 with PPMS; of them, 128 were evaluated at T8 (108 with RRMS and 20 with progressive clinical forms); 12 of them did not respond to scheduling for clinical and laboratory evaluation and were discontinued in the study. Scheduling was done by the study team who called directly to the patients. At T16, 122 patients (103 with RRMS and 19 with progressive clinical forms) attended the appointment for the clinical and laboratory evaluation and six patients were discontinued in the study. Of them, one patient moved to another country, one patient had his MS clinical diagnosis changed; one patient was hospitalized in the intensive therapy unit, while two other patients did not respond to the invitation.

Of the 140 MS patients included at the baseline, 9 (6.4%) were without treatment for MS; 87 (62.1%) were using IFN- β 1a, 34 (24.3%) were using glatiramer acetate, 8 (5.7%) were using natalizumab, and 2 (1.5%) were using fingolimod. Of the 128 MS patients evaluated at the T8 follow-up, 9 (7.0%) were without treatment for MS; 61 (47.5%) were using IFN- β 1a, 31 (24.2%) were using glatiramer acetate, 10 (7.8%) were using natalizumab, 12 (9.4%) were using fingolimod, and 1 (0.8%) was using dymethyl fumarate. Of the 122 MS patients evaluated at the T16 follow-up, 8 (6.5%) were without treatment for MS; 44 (36.2%) were using IFN- β 1a, 28 (23.0%) were using glatiramer acetate, 12 (9.8%) were using natalizumab, 27 (22.1%) were

using fingolimod, 1 (0.8%) was using dimethyl fumarate and 2 (1.6%) were using teriflunomide.

Associations with Δ EDSS responses from baseline to 16 months later

Table 1 shows the clinical and biological characteristics of subjects divided in two groups according to their Δ EDSS responses (from baseline to 16 months later). Using a cut-off score 0, we found that 47 patients showed an increase in Δ EDSS values, while 72 patients did not. While there were no significant differences in baseline T0 EDSS values between both groups, the EDSS values in the group with Δ EDSS > 0 increased from 3.4 (T0) to 4.5 (T8) and to 5.1 (T16). There were no significant differences in duration of illness, BMI, waist circumference, sex, ethnicity, MetS, SAH, and the RRMS/SPMS+PPMS ratio between the two study groups. Using multivariate GLM analysis followed by tests for between-subject effects, age was somewhat higher ($P=0.025$), there were significantly more smokers ($P=0.004$), higher Hcy ($P=0.049$) and PTH ($P=0.009$) and lower folic acid ($P=0.023$) in the study sample with increasing Δ EDSS values compared with the others. Nevertheless, these data were not corrected for extraneous variables as we only want to show the measured values in our study samples. The analyses in the sections below show the effects of biomarkers on EDSS scores while adjusting for the relevant extraneous variables (including age, sex, BMI, smoking).

Effects of time on the biomarkers

Table 2 shows the outcome of LMM analyses, repeated measurements, a first with the EDSS score (from T0 to T8 to T16) as dependent variable and time, Δ EDSS and the time *versus* Δ EDSS interaction as primary explanatory variables (while adjusting for the abovementioned

extraneous variables). We found a significant interaction time *versus* Δ EDSS indicating that in patients with Δ EDSS > 0 the EDSS score increased while in those with Δ EDSS ≤ 0 the EDSS scores decreased over time. Age had a significant effect on the Δ EDSS scores ($F=21.19$, $df=1/114.0$, $p<0.001$). **Table 2** shows also the results of LMM analyses with the biomarkers (from T0 to T8 to T16) as dependent variables and time as primary explanatory variables (while adjusting for the abovementioned extraneous variables). We found that Hcy levels significantly decreased over time with significant differences between the three time points. Folic acid was significantly lower at T16 than at T0. PTH was significantly higher at T16 than at T0 and T8, while calcium was significantly different between the three time points and increased from T0 \rightarrow T8 \rightarrow T16. IL-4 was significantly lower at T16 than T0, while AOPP decreased from T0 \rightarrow T8 \rightarrow T16. There was no significant effect of time on vitamin D, hsCRP, IL-6 and IL-17.

Associations between biomarkers and EDSS values over time

In order to examine the associations over time (from baseline T0 to T16) between the biomarkers (explanatory variables) and EDSS values we have performed LMM analysis with the EDSS values over time as repeated measures, while adjusting for clinical forms of MS and the five different treatment groups. **Table 3** (LMM #1) shows that the EDSS scores were significantly associated with HAS (positively), age (positively), IL-17 and AOPP (all positively). The EDSS score was significantly higher in those with HAS (mean \pm SE = 4.98 ± 0.37) *versus* those without (3.87 ± 0.33). **Table 3** (LMM #2) shows that changes in EDSS scores were, after introducing HAS, age and treatment, significantly associated with AOPP, $zIL6+zIL17-zIL4$ (positively) and $zHcy-zfolic\ acid$ (positively).

Prediction of EDSS (from T8 to T16) by biomarkers (from T0 and T8)

In order to delineate whether biomarkers may predict the EDSS values some months later, we performed the LMM analysis with EDSS values at T8 and T16 as repeated measurements (dependent variables) and biomarkers at T0 and T8 as explanatory variables. In this analysis EDSS at T8 is predicted by biomarkers at T0 and EDSS at T16 by biomarkers at T8. **Table 4** shows that the changes in EDSS from T8 to T16 are significantly and negatively predicted by lowered $z25(OH)D + zCa^{2+}$.

Prediction of EDSS values at T16 by biomarker values at T0, T8 and T16

Table 5 examines the prediction of EDSS at T16 (dependent variable) using the biomarkers which yielded significant results in Tables 1-4 as explanatory variables. In regressions #1 and #2 we entered the biomarkers obtained at T0 and T8 and in regression #3 we entered the biomarkers at T8 and T16. Regression #1 shows that 51.1% of the variance in EDSS at T16 was explained by SAH, smoking, age, sex (all positively), as well as by vitamin D at T0 and calcium at T0 (both negatively) and $zIL-6+zIL-17-zIL-4$ at T8 (positively). We have rerun the analysis without the three above-mentioned biomarkers and found that 32.6% of the variance in EDSS at T16 was explained by the regression on SAH, age, sex and $zHcy-zfolic\ acid$ at T0 (positively). Regression #3 shows that 40.3% of the variance in EDSS at T16 was explained by the regression on SAH, age, smoking, $zHcy-folic\ acid$ at T16 and $zIL-6+zIL-17-zIL-4$ at T16 (all positively) and vitamin D at T8 (negatively).

Differences between RRMS and SPMS+PPMS

Table 6 shows the results of a multivariate GLM analysis with the 10 biomarkers (at the three time points) used in this study as dependent variables and with RRMS versus SPMS+PPMS groups as primary explanatory variable, while adjusting for sex, time, smoking and age. We found a highly significant effect of groups, explaining around 13.9% of the variance in the biomarkers. Tests for between-subject effects showed that Hcy, vitamin D, PTH, IL-6, and IL-4 were significantly associated with the study groups; however, all of these biomarkers showed a weak effect on the clinical forms of MS.

Figure 1 shows the z values of all biomarkers in those two groups of MS. Hcy, PTH, IL-6 and IL-4 were significantly higher in SPMS+PPMS as compared with RRMS, while vitamin D was significantly lower in SPMS+PPMS.

Figure 2 shows the differences in the biomarkers between both males and females. The multivariate GLM analysis showed that there was also a highly significant effect of sex. Tests for between-subject effects showed significant effect of male sex with lower levels of folic acid ($F=5.83$, $df=1/250$, $P=0.016$), PTH ($F=4.98$, $df=1/250$, $P=0.027$), and hsCRP ($F=12.14$, $df=1/250$, $P=0.001$), and higher levels of Hcy ($F=29.10$, $df=1/250$, $P<0.001$), calcium ($F=3.92$, $df=1/250$, $P=0.049$), IL-17 ($F=4.74$, $df=1/250$, $P=0.030$) and AOPP ($F=6.02$, $df=1/250$, $P=0.015$) when compared with female sex. Moreover, age was significantly (and positively) associated with Hcy levels ($F=26.28$, $df=1/250$, $P<0.001$).

Best prediction of SPMS+PPMS

Table 7 shows the best prediction of SPMS+PPMS (dependent variable) using biomarkers and other possible clinical explanatory variables (ethnicity, sex, duration of illness, DM). We found that SPMS+PPMS was best predicted (all positive) by ethnicity (being not Caucasian, $p=0.033$), male sex ($p=0.001$), duration of illness ($p<0.001$), DM ($p=0.026$), PTH

($p=0.048$) and IL-6 ($p<0.001$) (all positively) and BMI ($p<0.001$; inversely). With this model, 86.3% of the SPMS+PPMS patients were correctly classified with a sensitivity of 72.1% and specificity of 89.4%.

Discussion

The main finding of the present study is that a set of IMO&NS biomarkers were strongly associated with the changes in the disability over time in patients with MS, as evaluated with EDSS scores during a 16-month follow-up. The high levels of the immune-inflammatory response, as indicated by the composite index zIL-6+zIL-17-zIL-4, as well as low levels of 25(OH)D and folic acid were important biomarkers associated with the changes in EDSS over time in this cohort of MS patients. The association between the composite scores used in the present study, such as zIL-6+zIL-17-zIL-4 and zHcy-zfolic acid with the changes on disability over time are consistent with the immune imbalance and inflammatory and metabolic mechanisms that modulate pathophysiological cascades in the CNS followed by the destruction of myelin and axonal death.

Other important findings of the present study are some baseline characteristics of MS patients, such as the ethnicity (No Caucasian), sex (male), duration of illness and the presence of DM together with high levels of PTH and IL-6 are predictors of ProgMS, with high sensitivity and specificity. These results deserve to be discussed in detail.

The immune-inflammatory response mediated by Th17 cells plays a key role in the pathogenic mechanisms of MS (Zepp et al. 2011). Increased IL-17 expression has been detected in peripheral blood mononuclear cells of MS patients during disease relapses. Human endothelial cells from patients with MS express high levels of IL-17 receptors, which could facilitate Th17 infiltration into the CNS (Ferreira et al. 2014). Other studies have also demonstrated the expression of IL-17 and IL-6 in perivascular lymphocytes, astrocytes,

oligodendrocytes and in areas of active MS lesions (Matusevicius et al. 1999; Lock et al. 2002). Higher IL-17-secreting T cells were detected in the peripheral blood of patients with MS during the clinical remission phase as compared with healthy individuals, and *in vitro* IL-17 levels were directly associated with disability (Teixeira et al. 2013).

IL-6 has been implicated in the induction of pathogenic IL-17-producing T cells in autoimmune diseases. In patients with active RRMS, IL-6 signaling was shown to support T effector cell resistance to regulation by regulatory T cells (Treg), which may contribute to disease aggravation (Schneider et al. 2013). In both EAE and MS, IL-6 seems to affect the disease pathogenesis through its activity in the peripheral lymphoid organs (Petković and Castellano 2016).

The present study showed that there were significantly more smokers in the group with increasing disability scores over time, in agreement with previous reports (Overs et al. 2012). Smoking may initiate a pulmonary immune response that when coupled with genetic susceptibility or specific viral exposures may contribute to the development of MS. Smokers had also significantly worse MS disability at baseline than never-smokers as well as a 64% and 34% increased risk of reaching EDSS 4 and 6 as compared with non-smokers and former smokers, respectively (Zivadinov et al. 2009; Kannan and Yadav 2017). Current smoking was also associated with shortened times to reach EDSS 4 and EDSS 8 (7.6 and 65.1 months earlier, respectively, *versus* never smoked) (Dagan et al. 2016).

Another important finding of the present study was that Hcy was significantly higher and folic acid significantly lower in MS patients with increasing disability scores. This is in agreement with our previous study, in which patients with ProgMS showed higher plasma levels of Hcy than those with RRMS (Oliveira et al. 2018). Higher Hcy levels are accompanied by a faster progression of MS as well as more disability compared to patients with lower Hcy levels (Skovierová et al. 2015). Hcy can induce BBB disruption (Kamath et al. 2006) and may cause

neuronal damage through other mechanisms including increased production of ROS (Faraci and Lentz 2004), promoting excitotoxicity via stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA), damaging neuronal DNA, and triggering apoptosis (Ho et al. 2002).

Deficiencies in vitamin B6, vitamin B12 and folic acid (vitamin B9) are associated with elevated plasma levels of Hcy. Vitamin B12 and folate have fundamental roles in CNS function especially with the methionine synthase-mediated conversion of Hcy to methionine, which is essential for synthesis of DNA and RNA (Moghaddasi et al. 2013). Hyperhomocysteinemia resulting from poor reconversion to methionine is related to low methionine availability. As methionine is an important methyl group donor in several biochemical processes, the hypomethylation of arginine of myelin basic protein (MBP) decreases the hydrophobicity of MBP and gives rise to less stable myelin structures and enhances degeneration of the myelin sheath (Ramsaransing et al. 2006).

The low levels of folic acid observed among the MS patients with increased disability over time, as well as among those with ProgMS, underscores the anti-inflammatory effects exert by this compound controlling the inflammatory response in a variety of inflammatory-related diseases (Samblas et al., 2018). Like methionine, folic acid acts as methyl donor precursors for DNA methylation, a key regulatory mechanism behind some inflammatory processes. Folic acid supplementation ameliorated hypertension, DM and stroke outcomes by reducing levels of inflammatory markers, such as CRP, IL-1 β , TNF- α and adhesion molecules (Cianciulli et al. 2016). Moreover, folic acid was able to modulate the inflammatory response in microglia cells shifting them toward an anti-inflammatory phenotype through regulating NF-kB related pathways (Cianciulli et al. 2016).

In the present study, the higher serum levels of PTH among patients with ProgMS (compared with those with RRMS) and among those with increasing disability over time are consistent with previous study (Kubicka-Baczyk et al. 2015). These authors showed that newly

diagnosed MS patients had the lowest serum levels of PTH compared to those observed in patients at a more advanced stage of the disease as well as in the control group; moreover, the increase in serum levels of PTH was observed with the increase in relapses. A study showed an association between MS disease process and pathological bone loss with increased prevalence of osteoporosis in men and women with MS and the proportion of male MS patients with reduced bone mass was high and disproportionate to their age and ambulation (Weinstock-Guttman et al. 2004). PTH stimulates IL-6 production by osteoblasts and liver cells, and IL-6 may modulate acute phase protein synthesis in the liver. Patients with hyperparathyroidism theoretically have higher levels of IL-6, CRP, or TNF- α than those with normal PTH levels. However, the casual relationship between PTH levels and inflammation remains to be elucidated (Cheng et al. 2014).

Comorbidities, such as hypertension and DM, are known to affect MS patients in a number of ways, including delaying time to diagnosis and reducing health-related quality of life (Conway et al. 2017). Underscoring this statement, another significant finding of the present study was that changes in disability over time were associated with hypertension, in agreement with previous reports (Marrie et al., 2011; Tettey et al. 2014; Conway et al. 2017). A number of explanations should be considered for unfavorable outcomes in MS patients with hypertension, such as through neurodegenerative processes as evidenced by accelerated brain atrophy (Salerno et al. 1992; Nagai et al. 2008). Moreover, patients with hypertension showed higher percentage of lateral ventricle volume change compared to non-hypertensive patients (Jakimovski et al. 2018) and anti-hypertensive medications may influence the disease course, or hypertension may, in some way, decrease the effectiveness of MS therapies (Conway et al. 2017).

In the present study we found that changes in EDSS scores were negatively associated with the index $zCa^{2+}+zvitD$ and positively associated with the index $zIL-6+zIL-17-zIL-4$ independently of hypertension, age, and treatment. These results are consistent with our previous

studies, which reported higher IL-4 levels among RRMS patients with mild disability compared with those with moderate/severe disability (Kallaur et al. 2013). Further, we also reported that patients with ProgMS presented higher levels of IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4, and IL-10 than controls (Kallaur et al. 2017b).

In the present study, changes in disability over time (from T8 to T16) were strongly associated with decreased 25(OH)D, underscoring a possible use of this biomarker to predict the disability progression, as previously reported (Harandi et al. 2012; Oliveira et al. 2017b). Moreover, vitamin D levels were inversely associated with MS activity as measured by brain magnetic resonance imaging (Mowry et al., 2012). It was also shown that vitamin D deficiency may contribute with a 11.5% increase in EDSS scores and may be one of the predictors of disability in MS patients independently of the redox status, (Oliveira et al., 2017b). In addition, low MS relapse rate was observed in patients with higher levels of vitamin D than those with lower levels of vitamin D (Smolders et al. 2008; Simpson et al. 2010). Some mechanistic explanations are that 1,25(OH)D inhibits Th17 cells differentiation via regulating NF-kB activity and expression of IL-17 (Sun et al., 2018); both 25(OH)D and 1,25(OH)D modulate Th17 effector responses and enhance regulatory function of CD4⁺T cells as well as that vitamin D drives CD4⁺ T cells to a CD25^{hi} FoxP3⁺CTLA⁺ phenotype, which has immunosuppressive and regulatory functions (Fawaz et al. 2016). Vitamin D also promotes the secretion of the anti-inflammatory cytokine transforming growth factor (TGF)- β 1 and suppresses the pro-inflammatory cytokines IL-17 and IFN- γ , reducing the frequency of IL-17A and IFN- γ producing cells (Fawaz et al. 2016).

In the present study, we found that the ProgMS subtypes (SPMS+PPMS) were positively associated with male sex and the presence of DM. MS is more common in women than men, with the female to male ratio as high as 3:1 and females have more relapses than men (Bove and Chitnis 2013; Ribbons et al. 2015). However, male sex has been associated with a poorer clinical

outcome in relapse-onset cohorts and men are reported to have a more rapid accumulation of disability (Bove et al. 2012; Shirani et al. 2012). Male patients also reach disability milestones faster than their female counterparts (Bove et al. 2013); display a more progressive form of MS (Gholipour et al. 2011) and have a poorer recovery after the initial MS relapse than women (Cossburn et al. 2012; Ribbons et al. 2015). As showed in the present study, male sex exerts higher effects in some biomarkers, including lower folic acid and higher Hcy, IL-6, IL-17, IL-4 and AOPP levels compared to female sex. Regarding DM, the results obtained here are in agreement with our previous study in which 40% of MS patients had insulin resistance and showed higher disability than those without insulin resistance (Oliveira et al. 2014).

Regarding the BMI, patients of the present cohort with low BMI values would be less likely to develop ProgMS. While higher BMI during adolescence and young adulthood has been reported as risk factor for MS, data are conflicting concerning the relationship between BMI and disease severity in MS. A cross-sectional study found that BMI had a modest correlation with MS severity and symptom in women (Richter et al. 2017). On the other hand, a large study showed that obesity was correlated with worse disability in women, but not in men (Bove et al. 2016). The neuroimmune disorder deficit schizophrenia is strongly predicted by a lowered BMI suggesting that BMI is a protective factor in the BMI range of 25-30 kg/m² (Kanchanatwan et al., 2018). Adipose tissue is a major source of pro-inflammatory and anti-inflammatory adipokines; therefore, can have both harmful and protective effects, respectively. The relationship between BMI and mortality rate results in a J-shaped curve, which shows that both high BMI and very low BMI are associated with increased mortality (Goyal et al. 2014). While BMI is an indicator of the overall body adiposity, it does not reflect the adipose capacity to shift toward to an anti-inflammatory status through adiponectin, one of the adipokines that may modulate the inflammatory response (Corrales-Medina et al. 2011; Goyal et al. 2014).

The present study has, at least, two limitations that need to be addressed. First, the relatively small sample size of patients with ProgMS that was followed-up; and second, the possible uncontrolled confounders variables, such as variant alleles in genes coding for inflammatory and metabolic molecules evaluated in this study, as well as lifestyle conditions (including the individual variability of alcohol consumption, physical activity, dietary habits, and sun exposure). On the other hand, some strengths are evident, including the longitudinal design with 16-month follow-up.

Conclusions

Taken together, the results showed that a set of IMO&NS biomarkers was associated with the changes in disability over time of MS patients, when evaluated during a 16-month follow-up. The changes from T8 to T16 were predicted by low levels of 25(OH)D and folic acid as well as by high levels of IL-6 and IL-17. Moreover, high levels of PTH, IL-6 and IL-4 and low levels of vitamin D together with ethnicity (non-Caucasian), sex (male), longer disease duration and the presence of DM could be useful biomarkers to predict the ProgMS. These results support the hypothesis that high levels of IL-6 and IL-17, as well as low level of vitamin D and folic acid may be possible targets for integrative therapies to modulate the inflammatory response and metabolic changes observed in MS patients.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Financial support

This study is partially 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.

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.

References

Adamczyk B, Adamczyk-Sowa M (2016) New Insights into the Role of Oxidative Stress Mechanisms in the Pathophysiology and Treatment of Multiple Sclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. doi.org/10.1155/2016/1973834.

American Diabetes Association (2014) Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care* 37 Suppl 1:S14-80.

Auffray C, Charron D, Hood L (2010) Predictive, preventive, personalized and participatory medicine: back to the future. *Genome medicine* 2:57.

Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), et al (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45(11):1353-60. doi: 10.1038/ng.2770.

Bove RM, Healy B, Augustine A, et al (2012) Effect of gender on late onset multiple sclerosis. *Mult Scler* 18(10):1472–9.

Bove R, Chitnis T (2013) Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol* 149:201–10.

Bove R, Musallam A, Healy BC, et al (2013) No sex-specific difference in disease trajectory in multiple sclerosis patients before and after age 50. *BMC Neurol* 13:73–80.

Bove R, Musallam A, Xia Z, et al (2016) Longitudinal BMI trajectories in multiple sclerosis: Sex differences in association with disease severity. *Mult Scler Relat Disord.* 8:136-40.

Brazil. IBGE. *Brazilian Institute of Geography and Statistics* (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. Available in://http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed in July 16, 2013.

Cheng SP, Liu CL, Liu TP, et al (2014) Association between Parathyroid Hormone Levels and Inflammatory Markers among US Adults. *Mediators Inflamm.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/709024>

Cianciulli A, Salvatore R, Porro C, et al (2016) Folic Acid Is Able to Polarize the Inflammatory Response in LPS Activated Microglia by Regulating Multiple Signaling Pathways. *Mediators Inflamm* 5240127. Epub 2016 Sep 25.

Comini-Frota ER, Vasconcelos CCF, Mendes MF on behalf of DCNI study group. (2017) Guideline for multiple sclerosis treatment in Brazil: Consensus from the Neuroimmunology Scientific Department of the Brazilian Academy of Neurology Orientações para tratamento da esclerose múltipla no Brasil: Consenso do Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia. *Arq Neuro-Psiquiatr* 75(1):57-65.

Conway DS, Thompson NR, Cohen JA. (2017) Influence of hypertension, diabetes, hyperlipidemia, and obstructive lung disease on multiple sclerosis disease course. *Mult Scler* 23(2):277-85.

Corrales-Medina VF, Valayam J, Serpa JA, et al (2011) The obesity paradox in community-acquired bacterial pneumonia. *Int J Infect Dis* 15:54-7.

Cosburn M, Ingram G, Hirst C, et al (2012) Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Mult Scler* 18(1):45–54.

Dagan A, Gringouz I, Segal G (2016) Disability Progression in Multiple Sclerosis is affected by the Emergence of Comorbid Arterial Hypertension. *J Clin Neurol* 12(3):345-50.

Faraci FM, Lentz SR (2004) Hyperhomocysteinemia, oxidative stress, and cerebral vascular dysfunction. *Stroke* 35(2):345-7.

Fawaz L, Mrad MF, Kazan JM, et al (2016) Comparative effect of 25(OH)D3 and 1,25(OH)2D3 on Th17 cell differentiation. *Clin Immunol* 166-167:59-71. doi: 10.1016/j.clim.2016.02.011.

Ferreira TB, Hygino J, Barros PO, et al (2014) Endogenous interleukin-6 amplifies interleukin-17 production and corticoid-resistance in peripheral T cells from patients with multiple sclerosis. *Immunology* 143(4):560-8.

Ferreti 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* 11:677-82.

Files DK, Jausurawong T, Katrajian R, Danoff R (2015) Multiple sclerosis. *Prim Care* 42(2):159-75. doi: 10.1016/j.pop.2015.01.007.

Gholipour T, Healy B, Baruch NF, Weiner HL Chitnis T (2011) Demographic and clinical characteristics of malignant multiple sclerosis. *Neurology* 76:1996–2001.

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.

Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE (2012) The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev* 248(1):87-103. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01134.x.

Goyal A, Nimmakayala KR, Zonszein J (2014) Is there a paradox in obesity? *Cardiol Rev* 22(4):163-70. doi: 10.1097/CRD.0000000000000004.

Grundy 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* 112:2735–52 .

Guzel I, Mungan S, Oztekin ZN, Ak F, et al (2016) Is there an association between the Expanded Disability Status Scale and inflammatory markers in multiple sclerosis? *J Chin Med Assoc* 79(2):54–7.

Harandi AA, Shahbeigi S, Pakdaman H, Fereshtehnejad SM, Nikravesch E, Jalilzadeh R (2012) Association of serum 25(OH) vitamin D3 concentration with severity of multiple sclerosis. *Iran J Neurol* 11:54-8.

Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD (2005) Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Brain Res Rev* 48(2):185-95.

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

Hood L, Friend SH (2011) Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol* 8:184–7.

Hu ML (1994) Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol* 233: 380–5.

Jakimovski D, Gandhi S, Paunkoski I, et al (2018) Hypertension and heart disease are associated with development of brain atrophy in multiple sclerosis: a 5-year longitudinal study. *Eur J Neurol*. doi: 10.1111/ene.13769.

James PA, Oparil S, Carter BL, et al (2014) Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311(5):507–20.

Kallaur AP, Oliveira SR, Colado Simão AN, et al (2013) Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of disease. *Mol Med Rep* 7(3):1010-20.

Kallaur AP, Reiche EM, Oliveira SR, et al (2017a) Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 54(1):31-44.

Kallaur AP, Oliveira SR, Simão ANC, et al (2017b) Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. *Mol Neurobiol* 54:2950–60.

Kamath AF, Chauhan AK, Kisucka J, et al (2006) Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood* 107(2):591-3.

Kanchanatawan B, Sriswasdi S, Thika S, et al (2018). Towards a new classification of stable phase schizophrenia into major and simple neuro-cognitive psychosis: Results of unsupervised machine learning analysis. *J Eval Clin Pract* ;24(4):879-891.

Kannan MR, Yadav V (2017) A Review of Vascular Disease Risk Factors and Multiple Sclerosis. *European Neurological Review* 13:90-3.

Kararizou E, Paraskevas G, Triantafyllou N, et al. (2013). Plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis in the Greek population. *J Chin Med Assoc* 76(11):611-4.

Kocer B, Engur S, Ak F, Yilmaz M (2009) Serum vitamin B12, folate, and homocysteine levels and their association with clinical and electrophysiological parameters in multiple sclerosis. *J Clin Neurosci* 16(3):399-403.

Koch M, Mostert J, Heersema D, De Kayser J (2007) Progression in multiple sclerosis: Further evidence of an age dependent process. *J Neurol Sci* 255:35–41.

Kubicka-Baczyk K, Labuz-Roszak B, Pierzchala K, Adamczyk-Sowa M, Machowska-Majchrzak M (2015) Calcium–phosphate metabolism in patients with multiple sclerosis. *J Endocrinol Invest* 38:635–42.

Küçükali Cİ, Kürtüncü M, Çoban A, Çebi M, Tüzün E (2015) Epigenetics of multiple sclerosis: an updated review. *Neuromolecular Med* 17(2):83-96.

Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurol* 33:1444-52.

Lock C, Hermans G, Pedotti R, et al. (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500–8.

Lublin FD, et al. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology* 3:278–286.

Marques, V.D.; Passos, G.R.D.; Mendes, M.F. et al (2018) Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis: Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. *Arq Neuropsiquiat* 76: 539-554, 2018.

Marrie RA, Cutter G, Tyry T (2011) Substantial adverse association of visual and vascular comorbidities on visual disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 17:1464–71.

Matuszevicius D, Kivisakk P, He B, et al (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101–4.

Mikulkova Z, Praksova P, Stourac P, Bednarik J, Michalek J (2011). Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 300:135-141.

Moghaddasi M, Mamarabadi M, Mohebi N, Razjoouyan, Aghaei M (2013) Homocysteine, vitamin B12 and folate levels in Iranian patients with Multiple Sclerosis: A case control study.

Clin Neurol Neurosurg 115(9):1802–5.

Mowry EM, Waubant E, McCulloch CE, et al (2012) Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 72(2):234-40. doi: 10.1002/ana.23591.

Nagai M, Hoshida S, Ishikawa J, Shimada K, Kario K (2008) Ambulatory blood pressure as an independent determinant of brain atrophy and cognitive function in elderly hypertension. *J Hypertens* 26(8):1636- 41.

National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106(25):3143-421

Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679–81.

Ohl K, Tenbrock K, Kipp M (2016) Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Exp Neurol* 277:58-67.

Oliveira SR, Simão AN, Kallaur AP, et al (2014) Disability in patients with multiple sclerosis: influence of insulin resistance, adiposity, and oxidative stress. *Nutrition* 30(3):268-73.

Oliveira SR, Kallaur AP, Reiche EMV, et al (2017a) Albumin and Protein Oxidation are Predictors that Differentiate Relapsing-Remitting from Progressive Clinical Forms of Multiple Sclerosis. *Mol Neurobiol* 54(4):2961-8.

Oliveira SR, Simão ANC, Alfieri DF, et al (2017b) Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *J Neurol Sci* 381:213-9.

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* 33(5):1393-9.

Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L (2017) Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 13(1):25-36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187.

Overs S, Hughes CM, Haselkorn JK, Turner AP (2012) Modifiable comorbidities and disability in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 12(5):610-7.

Petković F, Castellano B (2016) The role of interleukin-6 in central nervous system demyelination *Neural Regen Res* 11(12):1922–3.

Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al (2011) Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revision to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 69:292-302.

Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G (2010) Multiple sclerosis: Risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol* 9:727–39.

Ramsaransing GS, Fokkema MR, Teelken A, Arutjunyan AV, Koch M, De Keyser J (2006) Plasma homocysteine levels in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77:189-92.

Repetto M, Reides C, Gomez Carretero ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255: 107-117.

Reznick AZ, Packer L (1994) Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357–63 .

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(6):e0122686. doi: 10.1371/journal.pone.0122686

Richter B, Cutter G, Pandey K, Mohn J, Bacon TE, Kister I (2017) Body mass index correlates with multiple sclerosis disease and symptom severity in women, but not in men. *Neurol Disord Therap* 1(1): 1-5.

Río J, Montalban J, Tintore´ M, Codina A, Malinow MR (1994) Serum homocysteine levels in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 51:1181.

Salerno JA, Murphy DG, Horwitz B, et al. (1992) Brain atrophy in hypertension. A volumetric magnetic resonance imaging study. *Hypertension* 20(3):340–8.

Samblas M, Martínez JA, Milagro F (2018) Folic acid improves the inflammatory response in LPD-activated THP-1 macrophages. *Mediators Inflamm*. doi: 10.1155/2018/1312626.

Schneider A, Long SA, Cersaletti K, Ni CT, Samuels P, Kita M, et al (2013) In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Sci Transl Med* 5(170):170ra15. doi: 10.1126/scitranslmed.3004970.

Shirani A, Zhao Y, Kingwell E, et al (2012) Temporal trends of disability progression in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada (1975–2009). *Mult Scler*. 18(4):442–50.

Sicras-Mainar A, Ruíz-Beato E, Navarro-Artieda R, et al (2017) Comorbidity and metabolic syndrome in patients with multiple sclerosis from Asturias and Catalonia, Spain. *BMC Neurology* 17(1):134. doi: 10.1186/s12883-017-0914-2.

Simpson SJ, Taylor B, Blizzard L, et al (2010) Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68:193-203.

Skovierová H, Mahmood S, Blahovcová E, et al. (2015) Effect of homocysteine on survival of human glial cells. *Physiol Res* 64:747–54.

Smolders J, Menheere P, Kessels A, et al (2008) Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14:1220-4.

Sospedra M, Martin R (2016) Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 36:115–27.

Sun D, Luo F, Xing JC, et al (2018) 1,25(OH)₂ D₃ inhibited Th17 cells differentiation via regulating the NF-κB activity and expression of IL-17. *Cell Prolif* 51(5). doi: 10.1111/cpr.12461.

Swank RL, Dugan BB (1990) Effect of low saturated fat diet in early and late cases of multiple sclerosis. *Lancet* 336:37–9

Teixeira B, Bittencourt VC, Ferreira TB, et al (2013) Low sensitivity to glucocorticoid inhibition of in vitro Th17-related cytokine production in multiple sclerosis patients is related to elevated plasma lipopolysaccharide levels. *Clin Immunol* 148:209–18.

Tettey P, Simpson SJ, Taylor BV, et al (2014) Vascular comorbidities in the onset and progression of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 347:23-33.

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(12):1349-53.

Türkoğlu R, Giriş M, Gencer M, et al (2016) Serum Prolactin Levels in Multiple Sclerosis, Neuromyelitis Optica, and Clinically Isolated Syndrome Patients. *Arch Neuropsychiatry* 53:353-6.

Venturini D, Simão AN, Sripes NA, et al (2012) Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity* 20:2361-2366.

Weinstock-Guttman B, Gallagher E, Baier M, et al (2004) Risk of bone loss in men with multiple sclerosis. *Mult Scler* 10(2):170-5.

Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 161:2524–32.

Zepp J, Wu L, Li X (2011) IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. *Trends Immunol* 32:232–9.

Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Hashmi K, et al (2009) Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology* 73(7):504–10.

Table 1 Demographic, clinical, and laboratory biomarker data of multiple sclerosis patients in two groups divided according to changes in EDSS from baseline (T0) to 16 months later (T16)

Variable	ΔEDSS \leq 0 (n= 72)	ΔEDSS $>$ 0 (n=47)	F/X²	df	P value
Age (year)	40.8 (12.7)	46.1 (12.2)	5.12	1/117	0.025
EDSS T0	3.1 (2.3)	3.4 (2.3)	0.58	1/117	0.447
EDSS T8	2.6 (2.5)	4.5 (2.2)	17.37	1/112	<0.001
EDSS T16	2.0 (2.4)	5.1 (2.2)	53.85	1/117	<0.001
Duration of illness (year)	6.7 (5.6)	8.2 (5.0)	2.40	1/117	0.124
BMI (kg/m ²)	25.5 (4.8)	26.2 (5.5)	0.57	1/117	0.453
WC (cm)	88.8 (13.1)	93.7 (13.3)	3.70	1/112	0.057
Sex (F/M)	50/22	31/16	0.16	1	0.690
Caucasian/Non-Caucasian	60/12	36/11	0.83	1	0.363
Tobacco use (No/Yes)	68/4	36/11	8.22	1	0.004
MetS (No/Yes)	56/15	29/17	3.52	1	0.061
SAH (No/Yes)	60/12	32/15	3.77	1	0.052
Clinical forms					
RRMS/SPMS + PPMS	63/9	37/10	1.69	1	0.194
Homocysteine (μ mol/L)	10.96 (0.29)	11.96 (0.35)	3.92	1/253	0.049
Folic acid (ng/mL)	10.42 (0.43)	9.58 (0.52)	5.25	1/253	0.023
25(OH)D (ng/mL)	30.60 (1.65)	34.33 (1.99)	0.50	1/253	0.481
PTH (pg/mL)	55.25 (2.23)	64.25 (2.68)	6.93	1/253	0.009
Calcium (mg/dL)	8.65 (0.03)	8.60 (0.04)	1.18	1/253	0.279
hsCRP (mg/L)	3.67 (0.88)	4.94 (1.11)	0.24	1/253	0.623

IL-6 (pg/mL)	9.99 (4.83)	20.31 (6.11)	0.13	1/253	0.715
IL-17 (pg/mL)	16.59 (9.85)	40.19 (12.46)	3.81	1/253	0.052
IL-4 (pg/mL)	18.71 (29.70)	98.46 (37.59)	0.69	1/253	0.407
AOPP (μmol/L of chloramine-T equivalents)	114.19 (3.03)	112.82 (3.88)	0.09	1/253	0.761
Carbonyl protein (nmol/mg total protein)	3.05 (0.13)	3.36 (0.12)	0.53	1/246	0.468
Sulfhydryl group (μM)	288.9 (6.6)	291.0 (6.2)	0.27	1/246	0.601
TRAP/UA (μM Trolox)	188.6 (4.7)	182.0 (4.5)	1.47	1/246	0.226
CL-LOOH (cpm)	161.0 (5.8)	169.5 (5.6)	1.68	1/246	0.196

All results of analyses of variance (F values). χ^2 : results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as mean and standard error of mean (SEM) and categorical variables were expressed as absolute number. df: degree of freedom; EDSS: Expanded Disability Status Scale; BMI: body mass index; WC: waist circumference; MetS: metabolic syndrome; SAH: Systemic arterial hypertension; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis; Hcy: homocysteine; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; PTH: parathormone; hsCRP: C-reactive protein evaluated with high sensitivity assay; IL: interleukin; AOPP: advanced oxidation protein product; TRAP: Total radical-trapping antioxidant parameter determined by chemiluminescence; UA: uric acid; CL-LOOH: levels lipid hydroperoxides determined by tert-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescent

1 **Table 2** Results of linear mixed model analysis, repeated measures, with EDSS and the biomarkers measured in this study as dependent variables

Variables	Time			F	df	P value
	T0 ^A	T8 ^B	T16 ^C			
EDSS (Δ EDSS \leq 0)	3.18 (0.25)	2.76 (0.26)	2.08 (0.26)	5.56	2/113.1	0.005
EDSS (Δ EDSS $>$ 0)	3.28 (0.31)	4.40 (0.33)	5.00 (0.32)	88.40**	2/113.1	<0.001
Homocysteine (μ mol/L)	13.18 (0.67) ^{B,C}	12.42 (0.64) ^{A,C}	10.97 (0.62) ^{A,B}	21.09	2/112.1	<0.001
Folic Acid (ng/mL)	11.23 (0.94) ^C	9.89 (0.56)	9.24 (0.51) ^A	3.13	2/105.5	0.048
Vitamin D (ng/mL)	31.55 (2.47)	36.77 (2.75)	35.20 (2.75)	2.98	2/121.9	0.054
Parathormone (pg/mL)	59.99 (3.52) ^C	57.29 (3.67) ^C	65.46 (3.66) ^{A,B}	6.32	2/112.8	0.003
Calcium (mg/dL)	8.48 (0.06) ^{B,C}	8.64 (0.05) ^{A,C}	8.74 (0.06) ^{A,B}	9.98	2/118.2	<0.001
hsCRP* (mg/L)	4.73 (1.59)	4.18 (0.70)	4.94 (0.85)	0.62	2/123.5	0.539
IL-6* (pg/mL)	27.04 (8.83)	17.49 (4.16)	13.80 (3.34)	1.93	2/110.2	0.150
IL-17* (pg/mL)	35.47 (15.25)	25.22 (9.65)	20.06 (6.44)	1.17	2/111.3	0.314
IL-4* (pg/mL)	80.60 (48.80) ^C	49.36 (24.61)	27.43 (17.65) ^{A,B}	6.30	2/109.9	0.003
AOPP (μ mol/L of chloramine-T equivalents)	135.35 (5.21) ^{B,C}	116.13 (4.26) ^{A,C}	103.11(3.87) ^{A,B}	26.03	2/119.8	<0.001

1 All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; EDSS:
2 Expanded Disability Status Scale; Δ EDSS: change in the disability over time obtained
3 with EDSS T8 - EDSS T0, EDSST16 – EDSST8, as well as EDSST16-EDSS T0.
4 The Δ EDSS values were expressed either as continuous or dichotomized variables;
5 Δ EDSS \leq 0 was defined as no disability progression and Δ EDSS $>$ 0 was defined as
6 disability progression; hsCRP: C-reactive protein with high sensitivity assay; IL-6:
7 interleukin-6; IL-17: interleukin-17; IL-4: interleukin-4; AOPP: advanced oxidation
8 protein product; *Processed in LM transformation; **for the interaction time versus
9 Δ EDSS
10

Table 3 Results of linear mixed model analysis (LMM) analysis, repeated measures, with the EDSS values over time as dependent variables

	Explanatory variables	F	df	P value
LMM#1	Systemic arterial hypertension	7.94	1/111.05	0.006
	Treatment	5.33	4/310.60	<0.001
	Clinical forms	25.21	2/106.08	<0.001
	Age	10.99	1/114.45	0.001
	AOPP	7.36	1/288.99	0.007
	IL-17	4.80	1/249.01	0.029
LMM#2	Systemic arterial hypertension	6.64	1/98.53	0.011
	Treatment	3.93	4/188.22	<0.001
	Age	13.07	1/102.60	<0.001
	z(IL-6+IL-17- IL-4)	5.35	1/222.82	0.022
	AOPP	10.75	1/150.89	0.001
	z(Homocysteine-folic acid)	4.25	1/187.03	0.041

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; treatment: four different treatment of multiple sclerosis; clinical forms: relapsing-remitting multiple sclerosis and progressive forms of multiple sclerosis; z: results expressed as z scores; IL: interleukin; AOPP: advanced oxidation protein product

Table 4 Results of linear mixed model analysis, repeated measures, with the EDSS values over time from T8 to T16 as dependent variables and the biomarker data at T0 and T8 as explanatory variables

Explanatory variables	F	df	P value
Systemic arterial hypertension	4.13	1/104.23	0.045
Age	7.83	1/104.46	0.006
z(vitamin D+calcium)	7.53	1/82.46	0.007

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; z: results expressed as z scores

Table 5 Multiple regression analysis with EDSS T16 as dependent variable and biomarker at T0 and T8 or T8 and T16 as explanatory variables

Regression	Explanatory Variables	t	P value	Fmodel	df	P value	Partial Eta Square
#1 (T0+T8)	Model	-	-	10.20	7/60	<0.001	0.511
	SAH	+2.61	0.012				
	Tobacco use	+2.07	0.043				
	Age	+4.17	<0.001				
	Sex	+2.04	0.046				
	25(OH)D (T0)	-3.67	0.001				
	Calcium (T8)	-2.52	0.014				
	zIL-6+zIL-17-zIL-4 (T8)	+2.12	0.038				
#2 (T0+T8)	Model	-	-	11.73	4/97	<0.001	0.326
	SAH	+ 3.04	0.003				
	Age	+ 2.83	0.006				
	Sex	+2.46	0.016				
	zHcy-zfolic acid (T0)	+3.08	0.003				
#3 (T8+T16)	Model	-	-	10.03	6/89	<0.001	0.403
	SAH	+2.98	0.004				
	Age	+2.47	0.015				
	Tobacco use	+2.63	0.010				
	zHcy-zfolic acid (T16)	+2.24	0.028				
	25(OH)D (T8)	-2.25	0.027				
	zIL-6+zIL-17-zIL-4 (T16)	+2.57	0.012				

All results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; EDSS: Expanded Disability Status Scale; SAH: Systemic arterial hypertension; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; IL: interleukin; Hcy: homocysteine.

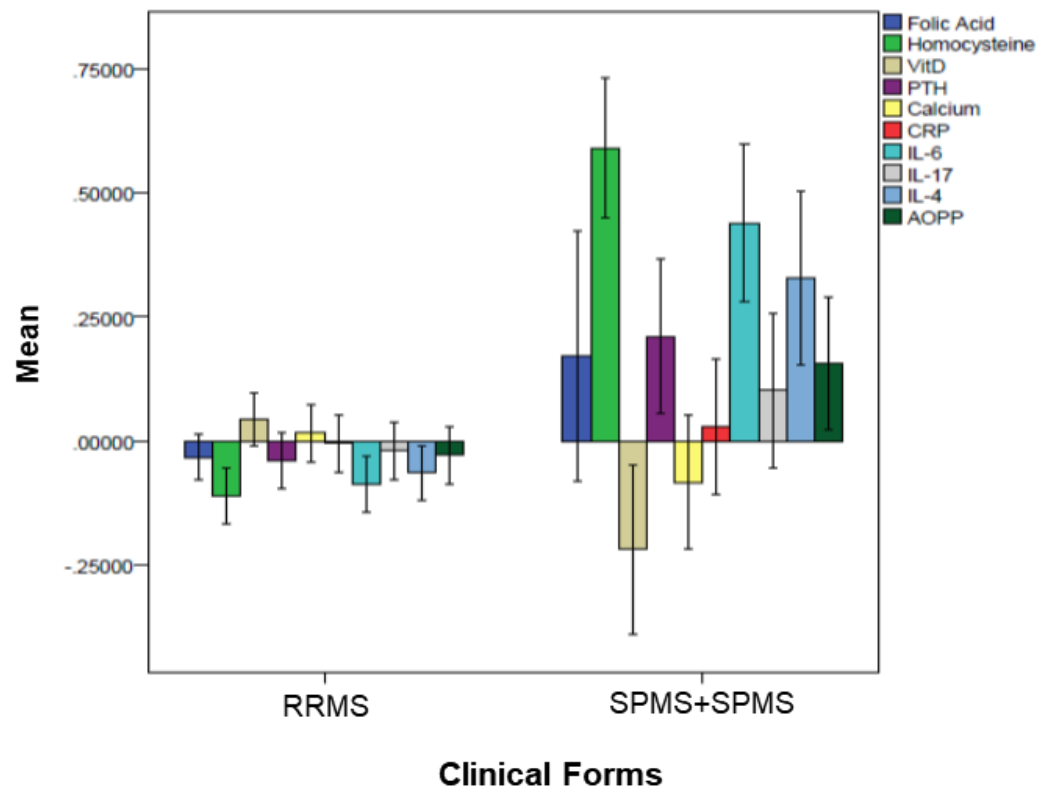


Figure 1 The z transformed values (SE) of the biomarkers in the relapsing remitting multiple sclerosis patients (RRMS) *versus* secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) plus primary progressive multiple sclerosis (PPMS). Homocysteine, parathormone (PTH), interleukin (IL)-6 and IL-4 were significantly higher in SPMS+PPMS as compared with RRMS, while vitamin D was significantly lower in SPMS+PPMS.

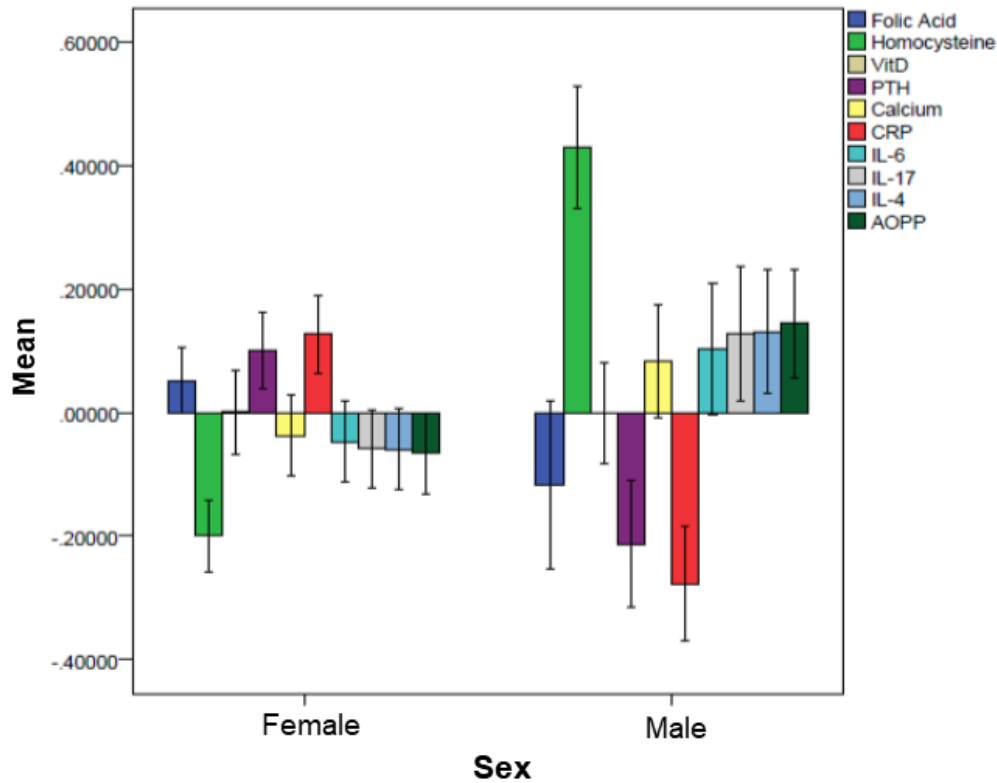


Figure 2 Differences in the inflammatory, metabolic and oxidative stress biomarkers between both men and female patients with multiple sclerosis. The biomarkers are z transformed (SE). The multivariate general liner model (GLM) analysis showed that there was a highly significant effect of sex. Tests for between-subject effects showed significant effect on folic acid ($F=5.83$, $df=1/250$, $p=0.016$), homocysteine ($F=29.10$, $df=1/250$, $p<0.001$), parathormone (PTH, $F=4.98$, $df=1/250$, $p=0.027$), calcium ($F=3.92$, $df=1/250$, $p=0.049$), C-reactive protein (CRP, $F=12.14$, $df=1/250$, $p=0.001$), interleukin (IL)-17 ($F=4.74$, $df=1/250$, $p=0.030$) and Advanced Oxidized protein products (AOPP, $F=6.02$, $df=1/250$, $p=0.015$).

Table 6 Differences between RRMS and progressive MS (SPMS + PPMS) in biomarker signature after adjusting for extraneous variables

Test	Dependent variables	Explanatory variables	F	df	P value	Partial Eta Square
Multivariable	All	MS groups	3.85	10/241	<0.001	0.139
	10	Sex	5.86	10/241	<0.001	0.196
	biomarkers	Time	6.49	20/482	<0.001	0.212
		Tobacco use	2.09	10/241	0.026	0.080
		Age	4.25	10.241	<0.001	0.150
Between subjects analysis	Folic Acid	MS groups	0.11	1/250	0.734	0.000
	Hcy	MS groups	4.09	1/250	0.044	0.020
	25(OH)D	MS groups	7.25	1/250	0.008	0.030
	PTH	MS groups	4.19	1/250	0.042	0.020
	Calcium	MS groups	1.37	1/250	0.244	0.010
	hsCRP	MS groups	1.02	1/250	0.313	0.000
	IL-6	MS groups	13.91	1/250	<0.001	0.060
	IL-17	MS groups	3.10	1/250	0.080	0.010
	IL-4	MS groups	10.66	1/250	0.001	0.040
	AOPP	MS groups	0.17	1/250	0.685	0.000

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; RRMS: relapsing-remitting multiple sclerosis; MS: multiple sclerosis; Hcy: homocysteine; 25(OH)D: 25-hydroxyvitamin D; PTH: parathormone; hsCRP: C-reactive protein determined with high sensitivity assay; IL: interleukin; AOPP: advanced oxidation protein product; SPMS: secondary progressive multiple sclerosis; PPMS: primary progressive multiple sclerosis

Table 7 Results of binary logistic regression analysis with primary progressive multiple sclerosis and secondary progressive multiple sclerosis clinical forms as dependent variables

Explanatory variables	Wald	df	P value	OR	95% CI
Non Caucasian	4.57	1	0.033	3.54	1.11-11.30
Male sex	12.05	1	0.001	5.34	2.07-13.76
Duration of illness	26.22	1	<0.001	1.27	1.16-1.39
Type 2 DM	4.97	1	0.026	5.59	1.23-25.39
Body mass index	14.55	1	<0.001	0.82	0.74-0.91
Parathormone	3.92	1	0.048	1.54	1.00-2.36
Interleukin 6	20.57	1	<0.001	3.36	1.99-5.66

df: degree of freedom; OR: odds ratio; CI: confidence interval; DM: diabetes mellitus; with this model, 86.3% of the patients with progressive forms of multiple sclerosis were correctly classified with a sensitivity of 72.1% and specificity of 89.4%.

Artigo 2

Prolactin is not associated with disability and clinical forms in patients with multiple sclerosis

Wildéa Lice de Carvalho Jennings Pereira^{1,2}, Tamires Flauzino¹, Daniela Frizon Alfieri¹, Sayonara Rangel Oliveira^{1,3}, Ana Paula Kallaur¹, Andrea Name Colado Simão^{1,3}, Marcell Alysson Batisti Lozovoy^{1,3}, Damacio Ramón Kaimen-Maciel^{2,4}, Michael Maes^{5,6}, Edna Maria Vissoci Reiche^{1,3}

¹Laboratory of Applied Immunology, Health Sciences Center, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

²Outpatient Clinic for Neurology, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

³Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁴Clinical Neurology, Santa Casa de Misericórdia de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil;

⁵IMPACT Strategic Research Centre, School of Medicine, Deakin University, Geelong, Victoria, Australia.

⁶Department 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, Londrina State University, Av. Robert Koch, 60, CEP 86.038-440, Londrina, Paraná, Brazil. Phone/FAX number: + 55-43-3371-2619. e-mail: reiche@sercomtel.com.br; ORCID: 0000-0001-6507-2839

Abstract

Background: The association between prolactinemia with disability and clinical forms multiple sclerosis (MS) patients remains unclear.

Objective: To evaluate the association of prolactin with clinical forms and disability over time in MS patients.

Methods: The study enrolled 101 patients with relapsing-remitting MS (RRMS) and 19 with progressive forms of MS (ProgMS). The disability, prolactin and ferritin serum levels were evaluated at baseline (T0), eight-month (T8) and 16-month (T16) follow-up.

Results: The disability over time was higher among patients with ProgMS than RRMS. Prolactin and ferritin did not differ over time between both groups. After introducing age and sex, the effects of prolactin on disability were no longer significant. Prolactin was associated with age and sex, whereby age was positively associated with disability. In the same way, after introducing age and sex, the effects of diagnosis on prolactin levels were no longer significant. Moreover, 21.6% of the variance in the disability was predicted by age and sex, while prolactin was not significant.

Conclusions: The effects of prolactin on the disability and clinical forms of MS patients may be spurious results because those correlations reflect the positive associations of age with the disability and the negative association of age with prolactin.

Keywords: Multiple sclerosis, prolactin, ferritin, disability, hyperprolactinemia, spurious result

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune-mediated disease of the central nervous system (CNS). Its etiology is not completely known but evidences suggest a complex interaction between genetic, environmental and hormonal factors.¹ Elevated prolactin serum levels have been associated with many autoimmune diseases, including MS², and this association is supported by findings that *PRL* and *PRLR* genes are located on the short arm of human chromosome 6, near the *HLA-DRB1* region, which is known for its association with many immune-mediated disorders.³ Prolactin is a peptide hormone secreted by the anterior pituitary gland under hypothalamus control, but it can also be produced in extra-pituitary locations, such as ovary, decidua, prostate, mammary gland, adipose tissue, brain, and immune cells, mainly lymphocytes.⁴⁻⁶ However, the extra-pituitary prolactin has different molecular weight and biologic activity.⁷

Prolactin secretion is also regulated by cytokines, such as interleukin (IL)-1, IL-2 and IL-6, which are stimulators, while endothelin-3 and interferon (IFN)- γ play an inhibitory role.⁸ Prolactin acts as a hormone and a cytokine in many different tissues, with both inflammatory and anti-inflammatory properties. Prolactin modulates the innate and adaptive immune responses, the maturation of CD4 and CD8 thymocytes to CD4⁺ CD8⁺ T cells through IL-2 receptor expression,^{9,10} promotes IL-6 and IFN- γ secretion, as well as plays a regulatory role on IL-2 levels.¹¹ Moreover, prolactin increases immunoglobulin production, stimulates the development of antigen-presenting cells expressing MHC class II, and upholds the co-stimulatory molecules CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and CD40.¹² On the other hand, an anti-inflammatory role of prolactin has been reported, such as the shift from a Th1/Th17 pro-

inflammatory response toward a Th2/T regulatory (Treg) response, which promotes tolerance and inhibits natural killer cells cytotoxicity during pregnancy.^{13,14}

A positive correlation between hyperprolactinemia and MS onset and relapses was reported.^{6,15} However, a meta-analysis showed that most MS patients have normal prolactin levels, whilst hyperprolactinemia was associated with clinical relapses in MS, especially among those with hypothalamic lesions or optic neuritis, questioning if this hormonal change is cause or consequence of a relapse.¹⁶

An association between prolactin and ferritin with clinical forms and sex among MS patients was also reported.¹⁷ To clarify the role of prolactin in MS pathophysiology, the aim of the present study was to evaluate the association of prolactin with clinical forms and accumulating disability over time in patients with MS.

Methods

Study subjects and clinical characteristics

A prospective study enrolled 120 patients with MS attend at Outpatient Specialized of University Hospital (AEHU) of Londrina, Southern Brazil, from December 2014 to March 2017. The patients were adult, both sexes, with the diagnosis of MS according to the revised McDonald Criteria,¹⁸ and classified into relapsing-remitting MS (RRMS), primary progressive MS (PPMS) and secondary progressive MS (SPMS).¹⁹ In this study, PPMS and SPMS clinical forms were named as progressive MS (ProgMS). All the 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. They were clinically and laboratory evaluated on admission or baseline (T0), eight-month follow-up (T8), and 16-month follow-up (T16). The disability was evaluated using the Expanded Disability Score Scale (EDSS).²⁰ The patients were treated according to the guidelines for MS treatment,²¹ and

the use of disease modifying drugs (DMDs), i.e. IFN- β 1a, natalizumab or glatiramer acetate, as well as fingolimod were recorded each clinical evaluation.

At T0, demographic, epidemiological, anthropometric and clinical data were obtained using standard questionnaire. The ethnicity was classified according to individual's self-perception of color skin as Caucasian and non-Caucasian. Body mass index (BMI), systolic blood pressure (SBP) and diastolic blood pressure (DBP) were measured and the mean of SBP and DBP was used in the analysis; the use of antihypertensive medication was an indication of systemic arterial hypertension (SAH)²². Metabolic syndrome (MetS) was diagnosed according to previous definition.²³ Exclusion criteria were the diagnosis of other autoimmune and infectious diseases or comorbidities, as well as the treatment with any drug, vitamin or antioxidant supplement that alter the laboratory biomarkers evaluated in this study.

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committee 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.

Prolactin and ferritin measurements

Venous blood samples were drawn without anticoagulant after fasting for 12 hours at T0, T8 and T16; further, they were centrifuged at 2,500 rpm for 15 min, separated in aliquots and stored at -80⁰ C until used. Prolactin and ferritin serum levels were determined using chemiluminescent microparticle assay (CMIA, Architect i2000, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) with protocol assay and reference values in accordance to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean and \pm standard deviation (\pm SD) and categorical variables as absolute number (n) and percentage (%). Analysis of variance (ANOVA) was used to assess intergroup differences in scale variables and analysis of contingency tables (X^2 -test) to check associations between nominal variables. A linear mixed model (LMM) analyses was used to examine the associations between changes in the EDSS score (from T0 to T8 to T16, repeated measures) as dependent variable and prolactin with or without age and sex as explanatory variables. A LMM analysis was used with the prolactin levels at T0, T8 and T16 as dependent variables and diagnosis and time with and without sex and age as explanatory variables to examine the effects of MS diagnosis (RRMS *versus* progressive clinical forms) on prolactin levels. A LMM was also used to examine the associations between prolactin and ferritin (at T0, T8 and T16) with and without age and sex as additional explanatory variables. Prolactin and ferritin values were processed also in logarithm natural (Ln) transformations. Partial Least Squares analysis was used as a path modeling technique (SmartPLS).²⁴ Variables were introduced in the path models or as single indicators (e.g. sex or age) or as a latent vector (LV) extracted from various indicators in a reflective model (e.g. EDSS scores). We only performed PLS path analysis when the model complied with specific quality criteria, namely model fit standardized root mean residual < 0.08 and the composite constructs have adequate composite reliability (>0.80) with an average variance extracted >0.50 . We performed consistent PLS bootstrapping (2000 bootstraps) and calculated path coefficients with exact p-values (inner model) and t-values (outer model). Moreover, total effects, total indirect and specific indirect effects were interpreted. All statistical analyses were performed employing IBM SPSS Windows version 24. Tests were 2-tailed, and an alpha level of 0.05 indicated a statistically significant effect.

Results

Table 1 shows the socio-demographic data, EDSS, prolactin and ferritin at three time points in MS patients divided into those with RRMS and ProgMS. Patients with ProgMS were somewhat older and showed more males than those with RRMS. There were no differences in age at onset, BMI, smoking behavior, MetS and SAH between both diagnosis groups. The disability registered at T0, T8 and T16 was higher among the patients with ProgMS than those with RRMS. There were no significant differences in T0, T8 and T16 prolactin and ferritin levels between both study groups.

In order to examine the associations between changes over time (T0, T8 and T16) in prolactin and EDSS, we used a linear mixed model analysis with EDSS as dependent variable and prolactin with or without age and sex as explanatory variables. **Table 2** shows that there was a significant association between prolactin and EDSS when age and sex were not entered in the regression analysis. Nevertheless, after introducing age and sex in the analysis, we found that the effects of prolactin on EDSS score were no longer significant. Regression #3 in Table 2 shows that prolactin was significantly associated with age and sex, whereby age was significantly and positively associated with the EDSS score, whilst females showed significantly higher prolactin levels than males (18.8 ± 0.94 ng/mL *versus* 11.20 ± 1.38 ng/mL, $P < 0.05$).

In order to examine the effects of MS diagnosis (RRMS *versus* ProgMS) on prolactin levels, we have carried out a LMM analysis with prolactin levels at T0, T8 and T16 as dependent variables and diagnosis and time with and without sex and age as explanatory variables. Regression #1 in **Table 3** shows that diagnosis was significantly associated with prolactin levels with higher prolactin levels in RRMS than in the ProgMS (17.13 ± 0.87 ng/mL *versus* 12.41 ± 2.00 ng/mL). Regression #2 in Table 3 shows that, after introducing age and sex, the effects of diagnosis on prolactin levels were no longer significant ($P = 0.563$).

Further, we examine whether prolactin may have protective effects by attenuating the inflammatory response. Towards this end, we examined the associations between prolactin and an inflammatory biomarker, namely ferritin (at T0, T8 and T16) using a LMM with and without age and sex as additional explanatory variables. Table 4, regression #1, shows that prolactin is significantly and negatively associated with ferritin ($P < 0.001$) and that diagnosis and time (T0, T8 and T16) have no significant effects on ferritin levels ($P = 0.927$ and $P = 0.358$, respectively). Nevertheless, after introducing age and sex, this association between prolactin and ferritin was no longer significant ($P = 0.599$), whilst diagnosis (but not time) became significant ($P = 0.001$). Thus, ferritin was significantly higher in RRMS than in the ProgMS (239.5 ± 10.3 ng/mL *versus* 131.5 ± 21.7 ng/mL). The latter ferritin values are therefore the real estimated marginal mean values after adjusting for age and sex, and these contrast the ferritin values shown in Table 1, which - as pointed out above - are not reliable estimates because they were not adjusted for relevant confounding variables. Ferritin was significantly predicted by age and sex, with positive associations between age and ferritin ($P < 0.001$) and higher levels in males than in females (316.9 ± 16.4 ng/mL *versus* 54.1 ± 14.3 ng/mL).

Different path models were used to analyze the associations between EDSS, prolactin and age and sex. First, a model whereby the EDSS score (at T16) was the outcome variable and prolactin (T0) the explanatory variable, while age and sex are introduced as predictors of prolactin (model #1). All variables were entered as single indicator variables. This path model shows that prolactin was significantly and positively associated with the EDSS score and that age and sex explained 19.6% of the variance in prolactin levels. However, such a model does not include the possible effects of age and sex on the EDSS scores. Therefore, we have constructed a second model (model #2) with the EDSS scores as outcome variable and prolactin (T0), age and sex as direct explanatory variables, while age and sex also predict

prolactin. This model with paths from age, sex and prolactin to an EDSS score latent construct extracted from the three EDSS values (T0, T8 and T16), which were entered as three indicator variables. The analysis shows that 21.7% of the variance in the EDSS score is predicted by age (while sex and prolactin are not significant), while 19.6% of the variance in prolactin is explained by effects of age and sex. In other words, the effects of prolactin on the EDSS scores are no longer significant after considering the effects of age on the EDSS scores. Thus, the associations between EDSS scores and prolactin as initially detected in the present study (see Table 2 and model #1) are in fact spurious correlations because those correlations reflect the positive associations of age with the EDSS score and the negative association of age with prolactin. All in all, the best model is which considers only the effects of age and sex on the EDSS scores. Doing so, we found that age and sex explained 21.6% of the variance in the EDSS scores and that both age (path coefficient=0.439, $P<0.001$) and sex (path coefficient=0.172, $p=0.049$) were significant in predicting the EDSS scores.

Discussion

The main finding of the present study is that prolactin is not associated with disability as well as the RRMS and ProgMS, suggesting that this association previously reported,^{4,15,16,25} may be a spurious result. An apparent association between prolactin and disability was no longer significant when age and sex were entered in the statistical analysis, showing that this result actually reflects the positive associations of age with the EDSS score and the negative association of age with prolactin. The interpretation of this path model is that age significantly affects the disability over time, as well as the prolactin levels and that prolactin does not function as a mediator for effects of age (and sex) on the EDSS.

The second important result of our study is that also the apparent, inverse association between ferritin and prolactin levels may be also a spurious correlation. Such correlation

could suggest a protective role of prolactin on the inflammatory response. Ferritin is a classic biomarker of inflammatory response in different conditions, such as infection, inflammatory diseases, and MS.^{17,26} Therefore, a negative association between ferritin and prolactin levels could suggest a possible anti-inflammatory effect of prolactin in MS for example by effects on Th1 and Th2 cytokine profiles and a regulatory role on IL-2 levels.¹¹ Moreover, prolactin may act through alterations in Th2/Treg response.^{13,14} Nevertheless, after considering the effects of age and sex in the analysis, the association between ferritin and prolactin was no longer significant, indicating that the inverse associations between both factors (without controlling for age and sex effects) are in fact spurious correlations. On the other hand, controlling for age and sex revealed that ferritin levels are significantly higher in RRMS than in the ProgMS, whilst without controlling for age and sex these differences could not be detected. These results show that not adjusting for age and sex may lead to erroneous results.

The present study also underscores the significant role of age and sex in the ProgMS. Patients with ProgMS were somewhat older and showed more males than the RRMS. Some authors also found that ProgMS clinical forms seem to exhibit only the slightest gender bias (1.1–1.3 to 1.0) unlike the 3:1 female to male predominance of MS overall.^{14, 27}

Hyperprolactinemia in MS still a matter of debate and the results are conflicting. In a case-control study, higher serum levels of prolactin were observed during relapses of RRMS patients compared to healthy controls;²⁵ however, the sample number of this study was limited. Other study showed that 70% of reduction in relapse risk during the third trimester of pregnancy was observed in RRMS patients with a rebound increase in relapse risk during the first three-month post-partum.²⁸ Perhaps, prolactin level drives postpartum relapses; however, a study showed that breastfeeding, which is accompanied by high prolactin levels may play a protective role against post-partum MS relapses.²⁹

Elevation of prolactin may be part of a nonspecific hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation caused by demyelination and/or neurodegeneration. Higher levels of adrenocorticotrophic, growth, luteinizing, and follicle-stimulating hormones, as well as testosterone, cortisol, noradrenalin and dopamine were also observed in MS patients compared to controls.^{4,16} It is important to mention that among healthy individuals, psychosocial stress led to significant increases in plasma prolactin, adrenocorticotrophic hormone and cortisol.³⁰

Mild-to-moderate hyperprolactinemia was found in 30% of MS patients and is speculated to be related to hypothalamic lesions,³¹ and patients with optic neuritis caused by the loss of inhibitory function of the hypothalamus on prolactin secretion.¹⁶ Post-mortem studies reveal that hypothalamic lesions are associated with more severe MS, which may explain the elevated rate of hyperprolactinemia seen among patients with ProgMS.^{16,17,32} On the other hand, we found that diagnosis of RRMS or ProgMS was significantly associated with prolactin levels, with higher prolactin levels in RRMS than in the ProgMS. However, severe optic neuritis is also thought to be associated with hyperprolactinemia due to the damage to adjacent tuberoinfundibular dopaminergic neurons, which project from the mediobasal hypothalamus to the median eminence.³³ Therefore, the high levels of prolactin could be the consequence of the dysregulation of the inhibitory control rather than by MS per se.

The conflicting results of prolactin levels obtained in MS patients from different population worldwide may be due to small cohort size of MS patients, as well as the inclusion of patients with different clinical forms of MS and genetic background presented by the most studies aforementioned. Moreover, prolactin levels were often analyzed without controlling for possible sex effects in MS progression and susceptibilities.¹⁷

Our results underscore that hyperferritinemia is implicated in the pathogenesis of RRMS.²⁵ These authors found that MS patients with higher ferritin levels showed higher disease progression than those with lower ferritin levels, and that progression of disease was significantly and positively associated with hyperferritinemia. Moreover, these authors showed that the combination of serum ferritin levels and oxidative stress biomarkers were responsible for 13.9% in the MS disease progression. Hyperprolactinemia was observed in 6.7% and hyperferritinemia in 8% of MS patients, both of which were significantly more common in the patients group compared with controls.¹⁷ Among female MS patients, hyperprolactinemia was related to SPMS, whereas hyperferritinemia was associated with male gender and with the RRMS. Moreover, an inverse association was found between hyperferritinemia and RRMS in male patients.¹⁷

Other important finding of the present study was the higher baseline and follow-up disability levels among patients with ProgMS than those with RRMS, as well as age and male sex as factors predicting worse outcome in MS. The conversion of MS patients from RRMS to SPMS seems to be related to prolonged chronic inflammation in the CNS and to the patient age. Aging brain also plays an important role in the course of ProgMS.³⁴ Although most autoimmune diseases, including MS, are more frequent among female, symptom severity, disease course may also differ between males and females. While MS as well as RRMS are more frequent among females than males, the ProgMS is more frequent among males than females. This sex disparity may be attributable to X-chromosome inactivation, differences in the expression of steroid hormones, which modulate the immune response towards a Th2 phenotype, whilst in men a Th1 response may be predominant.¹⁴ Therefore, the sex-based different immune response profile may result in an increased progression of the disease in males, as well as a higher prevalence of ProgMS than in women.³⁵

The small sample size of patients with ProgMS may have limited the power to detect small differences between the groups of the present study. However, a strength of the current study is the adjustment of the statistical analyses for lurking variables (age and sex), which possibly guarantees the reliability of the results obtained.

Conclusions

Our findings do not support the hypothesis that the disability of MS patients is associated with a hyperprolactinemic state, but rather they suggest that associations between the EDSS and prolactin levels may be spurious correlations. Actually, age and sex are real factors that exert a role in the pathophysiology of MS and are associated with the clinical forms and disability over time. Nevertheless, this finding should be replicated in other samples to further examine the role of prolactin in the pathophysiology of MS.

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 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).

References

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 2016; 36:115–27.
2. Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Prolactin and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 2018; 9:1-8.
3. Mellai M, Giordano M, D'Alfonso S, et al. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Human Immunology* 2003; 64(2), 274–84. doi:10.1016/s0198-8859(02)00804-2.
4. Heesen C, Gold SM, Bruhn M, et al. Prolactin stimulation in multiple sclerosis--an indicator of disease subtypes and activity? *Endocr Res* 2002; 28(1-2):9-18.
5. Majumdar A, Mangal NS. Hyperprolactinemia. *J Hum Reprod Sci* 2013; 6(3):168–75. doi:10.4103/0974-1208.121400
6. Correale J, Farez MF, Ysraelit MC. Role of prolactin in B cell regulation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2014; 269(1–2):76–86. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.02.007.

7. Sinha Y. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354–369.
8. Devi YS, Halperin J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1):400–10. doi:10.1016/j.mce.2013.09.016
9. Vera-Lastra O, Jara LJ, Espinoza LR. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2002; 1(6):360–4. doi:10.1016/S1568-9972(02)00081-2
10. Pereira Suarez AL, Lopez-Rincon G, Martinez Neri PA, et al. Prolactin in inflammatory response. *Adv Exp Med Biol* 2015; 846:243–64. doi:10.1007/978-3-319-12114-7_11
11. Mackern-Oberti JP, Jara EL, Riedel CA, et al. Hormonal modulation of dendritic cells differentiation, maturation and function: implications for the initiation and progress of systemic autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 65(2):123–36. doi:10.1007/s00005-016-0418-6.
12. Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 2005; 101(2):123–43. doi:10.1016/j.imlet.2005.05.014
13. Borchers AT, Naguwa SM, Keen CL, et al. The implications of autoimmunity and pregnancy. *J Autoimmun* 2010; 34(3):287–99. doi:10.1016/j.jaut.2009.11.015
14. Ortona E, Pierdominici M, Maselli A, et al. Sex-based differences in autoimmune diseases. *Ann Ist Super Sanita* 2016; 52(2):205–12. doi:10.4415/ann_16_02_12
15. Azar ST, Yamout B. Prolactin secretion is increased in patients with multiple sclerosis. *Endocr Res* 1999; 25(2):207–14. doi:10.1080/07435809909066142.
16. Zhornitsky S, Yong VW, Weiss S, et al. Prolactin in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2012; 19(1):15–23. doi: 10.1177/1352458512458555.

17. Da Costa R, Szyper-Kravitz M, Szekanecz Z, et al. Ferritin and prolactin levels in multiple sclerosis. *Isr Med Assoc J* 2011; 13(2):91-5.
18. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69:292–302. doi: 10.1002/ana.22366
19. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46:907–11
20. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33:1444–52
21. Academia Brasileira De Neurologia. Recomendações no tratamento da Esclerose Múltipla e Neuromielite Óptica. 2. ed. São Paulo: Omnifarma, 2016.
22. James PA, Oparil S, Carter BL, et al. Evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 2014; 311(5):507–20.
23. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120(16):1640-5.
24. Ringle CM, Wende S, Becker J-M. SmartPLS 3. Bönningstedt: SmartPLS, 2015. Retrieved from <http://www.smartpls.com>.
25. Moshirzadeh S, Ghareghozli K, Harandi AA, et al. Serum prolactin level in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis during relapse. *J Clin Neurosci* 2012; 19(4):622-3. doi: 10.1016/j.jocn.2011.07.032.

26. Ferreira KPZ, Oliveira SR, Kallaur AP, et al. Disease progression and oxidative stress are associated with higher serum ferritin levels in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2017; 15;373:236-241. doi: 10.1016/j.jns.2016.12.039.
27. Cottrell DA, Kremenchutzky M, Rice GP, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 1999; 122(Pt 4):625–39.
28. Vukusic, S, Hutchinson, M, Hours, M. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMIS study): Clinical predictors of postpartum relapse. *Brain* 2004; 127: 1353–60
29. Langer-Gould, A, Huang, SM, Gupta, R. Exclusive breastfeeding and the risk of postpartum relapses in women with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009; 66: 958–63.
30. Lennartsson, AK, Jonsdottir, IH. Prolactin in response to acute psychosocial stress in healthy men and women. *Psychoneuroendocrinol* 2011; 36: 1530–9.
31. Kira J, Harada M, Yamaguchi Y, et al. Hyperprolactinemia in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1991; 102: 61–6.
32. Huitinga I, Erkut ZA, Van Beurden D, et al. Impaired hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and more severe multiple sclerosis with hypothalamic lesions. *Ann Neurol* 2004; 55: 37–45.
33. Yamasaki K, Horiuchi I, Minohara M, et al. Hyperprolactinemia in optico-spinal multiple sclerosis. *Intern Med* 2000; 39: 296–9.
34. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8:647-56
35. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007; 14:529-33.

Table 1 Socio-demographic, clinical and laboratorial characteristics at three time points in patients with multiple sclerosis (MS), according to clinical form during the follow-up period

Variable	RRMS (n= 101)	ProgMS (n=19)	F/X ²	df	P value
Age (year)	41.7 (12.3)	48.9 (12.8)	5.44	1/118	0.021
Sex (F/M)	74/27 (73.3/26.7)	8/11 (42.1/57.9)	7.18	1	0.007
Ethnicity (C/NC)	85 (84.1) /16 (15.9)	13 (68.4) /6 (31.6)	2.64	1	0.104
BMI (kg/m ²)	26.4 (5.4)	24.1 (4.2)	2.90	1/118	0.091
Smoking (N/Y)	89 (88.1) /12 (11.9)	15 (78.9) /4 (21.1)	1.16	1	0.281
MetS (N/Y)	73 (72.3) /27 (26.3)	12 (63.2) /7 (36.8)	0.76	1	0.384
SAH (N/Y)	82 (81.2) /19 (18.8)	13 (68.4) /6 (31.6)	1.58	1	0.209
Age disease onset (year)	35.1 (10.6)	36.5 (9.9)	0.27	1/118	0.606
EDSS T0	2.63 (1.88)	6.29 (1.57)	63.3	1/115	<0.001
EDSS T8	2.68 (2.23)	6.61 (1.32)	55.0	1/113	<0.001
EDSS T16	2.61 (2.48)	6.42 (1.88)	40.4	1/118	<0.001
Prolactin (ng/mL) T0*	19.4 (19.7)	15.6 (11.9)	2.43	1/115	0.122
Prolactin (ng/mL) T8*	16.3 (11.1)	11.6 (5.1)	2.41	1/117	0.124
Prolactin (ng/mL) T16*	18.8 (32.2)	11.1 (6.3)	0.50	1/113	0.483
Ferritin (ng/mL) T0	179.6 (196.9)	166.9 (152.1)	0.01	1/116	0.899
Ferritin (ng/mL) T8	175.6 (193.7)	173.9 (145.5)	0.01	1/116	0.918
Ferritin (ng/mL) T16	170.7 (219.5)	169.3 (196.9)	0.05	1/117	0.818

All results of analyses of variance (F values; ANOVA). χ^2 : results of analyses of contingency tables. Continuous variables were expressed as mean and standard error of mean (SEM) and categorical variables were expressed as absolute number. df: degree of freedom; F: female; M: male; C:

Caucasian; NC: non Caucasian; BMI: body mass index; N: no; Y: yes; MetS: metabolic syndrome; SAH: Systemic arterial hypertension; EDSS: Expanded Disability Status Scale; T0: time at the inclusion in the study (baseline); T8: eight-month follow-up; T16: 16-month follow-up; *RRMS*: relapsing-remitting multiple sclerosis; *ProgMS*: progressive multiple sclerosis.

Table 2 Result of linear mixed model analysis with EDSS (T0-T8-T16) as dependent variable and prolactin with or without age and sex as covariates

Dependent variables	Explanatory variables	F	df	P value
EDSS (T0, T8, T16)	Prolactin (-)	10.31	1/335	0.001
EDSS (T0, T8, T16)	Prolactin	0.56	1/337	0.455
	Age (+)	66.38	1/336	<0.001
	Sex (Male > Female)	7.70	1/335	0.006
Prolactin (T0, T8, T16)	Age (-)	17.63	1/338	<0.001
	Sex (Male >Female)	47.38	1/339	<0.001

All the results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; EDSS: Expanded Disability Status Scale; T0: time at the inclusion in the study (baseline); T8: eight-month follow-up; T16: 16-month follow-up; (-): negative association; (+): positive association

Table 3 Results of linear mixed model analysis with prolactin levels as dependent variable and diagnosis of RRMS or ProgMS as explanatory variable

Dependent Variables	Explanatory Variables	F	df	P value
Prolactin (T0, T8, T16)*	Diagnosis	8.82	1/339	0.003
	#1 Time (T0, T8, T16)	3.50	1/213	0.032
Prolactin (T0, T8, T16)*	Diagnosis	0.34	1/335	0.563
	Time	4.22	1/212	0.012
	#2 Age	15.55	1/336	<0.001
	Sex	42.05	1/337	<0.001

All the results of analyses of variance (F values); df: degrees of freedom; *processed in Logarithm natural transformation; T0: time at the inclusion in the study (baseline); T8: eight-month follow-up; T16: 16-month follow-up; *RRMS*: relapsing-remitting multiple sclerosis; *ProgMS*: progressive clinical forms of multiple sclerosis.

Table 4 Result of linear mixed model analysis with ferritin levels as dependent variable and prolactin levels with or without age, sex, and diagnosis as explanatory variables

Dependent Variables	Explanatory Variables	F	df	P value
Ferritin (T0, T8, T16)* #1	Diagnosis	0.01	1/345	0.927
	Time	1.03	1/231	0.358
	Prolactin*(-)	21.39	1/336	<0.001
Ferritin (T0, T8, T16)* #2	Diagnosis (RRMS >ProgMS)	11.74	1/343	0.001
	Time	0.70	1/230	0.496
	Prolactin*	0.28	1/333	0.599
	Age (+)	13.29	1/343	<0.001
	Sex (Male/Female)	197.33	1/343	<0.001

All results of analyses of variance (F values); df: degree of freedom; *RRMS*: relapsing-remitting multiple sclerosis; *ProgMS*: progressive MS; *processed in Logarithm natural transformation; T0: time at the inclusion in the study (baseline); T8: eight-month follow-up; T16: 16-month follow-up; (-): negative association; (+): positive association

6 CONCLUSÕES

Após a discussão dos resultados do artigo 1, podemos concluir:

- O estudo acompanhou 140, 128 e 122 pacientes com EM nos tempos T0, T8 e T16, respectivamente. Destes, 47 pacientes apresentaram acúmulo de incapacidade, aumentando de 3,4 (T0) para 4,5 (T8) e para 5,1 (T16);
- A alteração da incapacidade ao longo do tempo foi positivamente associada à HAS, idade, hsPCR, IL-17 e AOPP, enquanto foi associada negativamente com ácido fólico e cálcio. O índice de alteração da incapacidade (Δ EDSS) de T8 a T16 foi predito pela diminuição de 25(OH)D e ácido fólico obtidos nos tempos T0 a T8, e um aumento do escore composto de citocinas inflamatórias (IL-6+IL-17-IL-4) obtido nos tempos T0 e T8;
- 51,1% da alteração da incapacidade dos pacientes observada em T16 foram explicadas pelas variáveis HAS, tabagismo, idade, sexo e o escore de citocinas inflamatórias (IL-6+IL-17-IL-4) observadas no T8 (todas positivamente), assim como das variáveis 25(OH)D obtida no T0 e cálcio no T8 (todas negativamente);
- Em outro modelo de análise de predição, os resultados mostraram que 40,3% da alteração da incapacidade observada no T16 foram explicadas pelas variáveis HAS, tabagismo, idade, índice entre homocisteína e ácido fólico (Homocisteína – ácido fólico) obtidos no T16 assim como pelos índice inflamatório IL-6+IL-17-IL-4 obtidos no T16 (todas positivamente) e 25(OH)D no T8 (negativamente);
- Os valores de Hcy, PTH, IL-6 e IL-4 foram maiores e de 25(OH)D foram menores entre os pacientes com as formas progressivas da EM comparados aqueles com a forma EMRR;
- As características dos pacientes com EM, como etnia (não caucasiana), sexo (masculino), duração da doença e a presença de DM juntamente com níveis elevados de PTH e IL-6 são preditores de ProgMS, com alta sensibilidade e alta especificidade.

- A desregulação na resposta imune, alterações metabólicas associadas ao hiperparatireoidismo, Hcy e ácido fólico, bem como baixos níveis de vitamina D e cálcio, desempenham um papel na progressão da EM e de suas formas clínicas.
- Diante destes resultados, concluiu-se que um conjunto de biomarcadores IMO&NS, juntamente com HAS e idade, apresentou significativa associação com as alterações na incapacidade dos pacientes com EM durante 16 meses de acompanhamento e que podem ser úteis para prever o acúmulo da incapacidade ao longo do tempo em pacientes com EM.

Após a discussão dos resultados do artigo 2, podemos concluir:

- A incapacidade observada em T0, T8 e T16 foi maior entre pacientes com as formas progressivas do que aqueles com EMRR;
- Os níveis de prolactina e ferritina não diferiram ao longo do tempo entre as formas clínicas da EM;
- Após a introdução das variáveis idade e sexo na análise dos dados, os efeitos da prolactina na incapacidade deixaram de ser significativos. A prolactina foi associada com idade e sexo, sendo a idade positivamente associada à incapacidade;
- Da mesma forma, após a introdução das variáveis idade e sexo na análise dos dados, os efeitos do diagnóstico de EMRR ou de formas progressivas da EM sobre os níveis de prolactina, bem como a associação entre prolactina e ferritina, não foram mais significativos;
- 21,6% da variância da incapacidade foi prevista pela idade e sexo, enquanto a prolactina não foi significativa;
- Os efeitos da prolactina na incapacidade de pacientes com EM podem ser um resultado espúrio, porque essas correlações refletem as associações positivas de idade com a incapacidade e a associação negativa da idade com a prolactina.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo tem, pelo menos, duas limitações que precisam ser abordadas. Primeiro, o tamanho relativamente pequeno da amostra de pacientes com formas clínicas progressivas de EM pode ter limitado o poder de detectar pequenas diferenças entre os grupos do presente estudo. Segundo, as possíveis variáveis confundidoras que não puderam ser controladas no estudo, como alelos variantes nos genes que codificam as moléculas inflamatórias e metabólicas avaliadas neste estudo, bem como as condições de estilo de vida (incluindo a variabilidade individual do consumo de álcool, inatividade física, hábitos alimentares e exposição ao sol).

Por outro lado, alguns pontos fortes são evidentes, incluindo o delineamento longitudinal com 16 meses de acompanhamento clínico e laboratorial, a análise estatística robusta com ajuste de variáveis como idade, sexo, etnia e IMC, assim como os novos escores compostos com os resultados obtidos.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que, além da idade, sexo e desregulação da resposta imune inata e adaptativa, outros mecanismos podem estar envolvidos na fisiopatologia da EM, como alterações hormonais e metabólicas reveladas pelos níveis aumentados de homocisteína e PTH e diminuídos de ácido fólico, vitamina D e cálcio. Estas outras alterações podem explicar, em parte, porque muitos pacientes não apresentam boa resposta terapêutica com os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento dos pacientes com EM, uma vez que estes têm como alvo alguns componentes do sistema imune inato e adaptativo e que visam o retorno do equilíbrio da resposta imune.

Espera-se com este estudo um melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da incapacidade e nas formas clínicas da EM, assim como a identificação de possíveis marcadores laboratoriais que sejam capazes de identificá-las precocemente e que possam, também, contribuir para o desenvolvimento de possíveis novos alvos terapêuticos para uma terapia personalizada e integrativa no tratamento de pacientes com EM.

8 REFERÊNCIAS

ALBERTI, K. G. et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*, v. 120, p. 1640-1645, 2009.

AMORINI, A. M. et al. Increased of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clinical Biochemistry*, v. 42, p. 1001-1006, 2009.

ASCHERIO, A.; MUNGER, K. L.; LÜNEMANN J. D. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, v. 8, n. 11, p. 602–612, 2012.

AUFFRAY, C.; CHARRON, D.; HOOD, L. Predictive, preventive, personalized and participatory medicine: back to the future. *Genome Medicine*, v. 2, n. 57, 2010.

BAHREINI, S. A., et al. The role of non-HLA single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis susceptibility. *Journal of Neuroimmunology*, v. 229, n. 1-2, p. 5–15, 2010.

BARUKČIĆ, K.; BARUKČIĆ, I. Epstein Barr Virus—The Cause of Multiple Sclerosis. *Journal of Applied Mathematics and Physics*, v. 4, p. 1042-1053, 2016.

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

BESLER, H. T.; COMOGLU, S. Lipoprotein Oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, v. 6, p. 189-196, 2003.

BIKLE, D. D. Vitamin D regulation of immune function. *Vitamins & Hormones*, v. 86, p. 1-21, 2011.

BIZZOZERO, O. A. Protein carbonylation in neurodegenerative and demyelinating CNS Diseases. In: NAREN, L.; BANIK, S. K. R.; LAJTHA, A. (Org.). **Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology**: Brain and Spinal Cord Trauma, v. 3, Springer, 2009. p. 544-556.

BOMPRESZI, R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: An overview. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 8, n. 1, p. 20-30, 2015.

BRANDÃO, C. O. et al. Cytokines and intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis during clinical remission. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 63, p. 914-919, 2005.

BORBA, V. V.; ZANDMAN-GODDARD, G.; SHOENFELD, Y. Prolactin and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1-8, 2018.

BOVE, R. et al. Longitudinal BMI trajectories in multiple sclerosis: Sex differences in association with disease severity. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 8, p. 136-140, 2016.

BRASIL. IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the Population and Households: Results of the Universe. Available in: http://www.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Acesso em: 16 jul 2013.

BRUM, D. G. et al. Supplementation and therapeutic use of vitamin D in patients with multiple sclerosis: Consensus of the Scientific Department of Neuroimmunology of the Brazilian Academy of Neurology. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 72, n. 2, p. 152-156, 2014.

BURNESS, C. B.; DEEKS, E. D. Dimethyl Fumarate: A Review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs*, v. 28, n. 4, p. 373-387, 2014.

BUSKILA, D.; SUKENIK, S.; SHOENFELD, Y. The possible role of prolactin in autoimmunity. *American Journal of Reproductive Immunology*, v. 26, n. 3, p. 118-123, 1991.

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.

CALLEGARO, D. Epidemiology aspects. In: Tilbery, C. P. (Org.). **Multiple sclerosis in Brazil: clinical and therapeutic aspects**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 13-15.

CHEN, Y. C. et al. Serum levels of interleukin (IL)-18, IL-23 and IL-17 in Chinese patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 243, n. 1-2, p. 56-60, 2012.

CLAUSSEN, M. C.; KORN, T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: Teriflunomide. *Clinical Immunology*, v. 142, n. 1, p. 49-56, 2012.

COLES, A. J. Alemtuzumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*, v. 10, p. 29-33, 2013.

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

COMPSTON, A.; COLES A. Multiple sclerosis. *Lancet*, v. 372, n. 9648, p. 1502-17, 2008.

CONFAVREUX, C.; AIMARD, G.; DEVIC, M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*, v. 103, n. 2, p. 281-300, 1980.

CONFAVREUX, C.; COMPSTON, A. The natural history of multiple sclerosis. In: COMPSTON, A (Org.). *McAlpine's multiple Sclerosis*. 4. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2006. p. 183–272.

CORRALES-MEDINA, V. F. et al. The obesity paradox in community-acquired bacterial pneumonia. *International Journal of Infectious Disease*, v. 15, p. 54-7, 2011.

CORREALE, J.; FAREZ, M. F.; YSRRAELIT, M.C. Role of prolactin in B cell regulation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, v. 269, n. 1, p. 76–86, 2014.

COSTANZA, M. et al. Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology. *Autoimmunity Reviews*, v. 14, n. 3, p. 223-230, 2015.

COSTANZA, M.; PEDOTTI, R. Prolactin: friend or foe in central nervous system autoimmune inflammation? *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 12, 2016.

COYLE, P. K. et al. Best practice recommendations for the selection and management of patients with multiple sclerosis receiving natalizumab therapy. *Multiple Sclerosis*, v. 15, p. 26-36, 2009.

DANAEI, G. et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, v. 378, p. 31-40, 2011.

DE SOUZA, C. T. et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*, v. 146, p. 4192-4199, 2005.

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

DEVI, Y. S.; HALPERIN, J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 382, n. 1, p. 400-410, 2014.

DUTTA, R.; TRAPP, B. D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, v. 93, n. 1, p. 1-12, 2011.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R. M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends in Immunology*, v. 33, n. 12, p. 579-589, 2012.

ENZINGER, C. et al. Risk factors for progression of brain atrophy in aging: six-year follow-up of normal subjects. *Neurology*, v. 64, p. 1704-1711, 2005.

FARACI, F. M.; LENTZ, S. R. Hiperhomocysteinemia, oxidative stress and cerebral vascular dysfunction. *Stroke*, v. 35, p. 345-347, 2004.

FERRETI, G. et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Multiple Sclerosis*, v. 11, 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.

FRAGOSO, Y. D.; BROOKS, J. B. Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, v. 8, n. 3, p. 315-320, 2015.

FRAU, J. et al. New horizons for multiple sclerosis therapeutics: milestones in the development of ocrelizumab. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 14, p. 1093-1099, 2018.

FREEDMAN, M. S. et al. Teriflunomide added to interferon- β in relapsing multiple sclerosis: A randomized phase II Trial. *Neurology*, v. 78, n. 23, p. 1877-1885, 2012.

FREEDMAN, M. S.; KAPLAN, J. M.; MARKOVIC-PLESE, S. Insights into the Mechanisms of the Therapeutic Efficacy of Alemtuzumab in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, v. 4, n. 4, 2013.

GARNOCK-JONES, K. P. Alemtuzumab: a review of its use in patients with relapsing multiple sclerosis. *Drugs*, v. 74, p. 489-504, 2014.

GIANFRANCESCO, M. A.; BARCELLOS, L. F. Obesity and Multiple sclerosis susceptibility: a review. *Journal of Neurology & Neuromedicine*, v. 1, n. 7, p. 1-5, 2016.

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

GONSETTE, R. E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of Neurological Science*, v. 274, p. 48-53, 2008.

GOYAL, A.; NIMMAKAYALA, K. R.; ZONSZEIN, J. Is there a paradox in obesity? *Cardiology in Review*, v. 22, n.4, p.163-70, 2014.

GRANT, W. B.; HOLICK, M. F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative Medicine Review*, v. 10, p. 94-111, 2005.

GRATTAN, D.R. 60 years of Neuroendocrinology. The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology*, n. 226, p. T101–T122, 2015.

GRAY, O.; MCDONNELL, G. V.; FORBES, R. B. Intravenous immunoglobulins for multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2003; (4): CD002936.

GRECO, A. et al. Cerebrospinal fluid isoprostane shows oxidative stress in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, v. 53, n. 8, p. 1876-1879, 1999.

GRECO, A.; MINGHETTI, L.; LEVI, G. Isoprostanes, Novel Markers of Oxidative Injury, Help Understanding the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Research*, v. 25, p. 1357-1364, 2000.

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, p. 93–100, 1991.

GOURRAUD, P. A. et al. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological Reviews*, v. 248, n. 1, p. 87-103, 2012.

GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European Journal of Neurology*, 22 (2): 3-13, 2015.

GRZESIUK, A. K. Clinical and epidemiologic characteristics of 20 patients with multiple sclerosis in Cuiabá - Mato Grosso, Brazil. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 64, n. 3, 2006.

HARBO, H. F.; GOLD, R.; TINTORÉ, M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 6, n. 4, p. 237-248, 2013.

HARKIOLAKI, M. et al. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity cross reactivity to common microbial peptides. *Immunity*, v. 30, p. 348–357, 2009.

HARPSØE, M. C. et al. Body mass index and risk of autoimmune diseases: a study within the Danish National Birth Cohort. *International Journal of Epidemiology*, v. 43, p. 843-855, 2014.

HAUSER, S. L.; OKSENBERG, J. R. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*, v. 52, p. 61–76, 2006.

HEESEN, C. et al. Prolactin stimulation in multiple sclerosis--an indicator of disease subtypes and activity? *Endocrine Research*, v. 28, p. 9-18, 2002.

HEDSTRÖM, A. K.; OLSSON, T.; ALFREDSSON, L. Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk. *Multiple Sclerosis*, v. 22, p. 878-883, 2016.

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

HOHLFELD, R.; WEKERLE, H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 2, p. 14599 –14606, 2004.

HOLICK, M. F. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *Southern Medical Journal*, v. 98, p.1024-1027, 2005.

HOOD, L.; FRIEND, S. H. Predictive, personalized, preventive, participatory (P4) cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 8, p.184–7, 2011.

HOSSEIN-NEZHAD, A.; HOLICK, M. F. Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 88, p. 720-755, 2013.

HU, M. L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 380–5, jan. 1994.

HUANG, M. et al. Impaired carotid baroreflex control of arterial blood pressure in multiple sclerosis. *Journal of Neurophysiology*, v.116, p. 81-87, 2016.

HUBBARD, E. A.; MOTL, R. W.; FERNHALL, B. Sedentary Behavior and Blood Pressure in Patients with Multiple Sclerosis. *International Journal of MS Care*.v.20, n.1, p. 1-8, 2018.

IMAMURA, K. et al. Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 87, p. 281-285, 1993.

IMITOLA, J.; CHITNIS, T.; KHOURY, S. J. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 106, p. 163-177, 2005.

JAMROZ-WISNIEWSKA, A. et al. Paraoxonase 1 activity in different types of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, v. 15, p.399-402, 2009.

JEFFERSON, A. L. et al. Inflammatory biomarkers are associated with total brain volume: The Framingham Heart Study. *Neurology*, v. 68, p. 1032–1038, 2007.

JI, Q.; PERCHELLET, A.; GOVERMAN, J. M. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nature Immunology*, v. 11, p. 628–634, 2010.

JOHNSON, K. P. et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*, v. 45, n. 7, p.1268-1276, 1995.

KALLAUR, A. P. et al. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of disease. *Molecular Medicine Reports*, v. 7, n. 3, p. 1010-1020, 2013.

KALLAUR, A. P. et al. Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. *Molecular Neurobiology*, v. 54, p. 2950–60, 2017.

KAMATH, A. F. et al. Elevated levels of homocysteine compromise blood-brain barrier integrity in mice. *Blood*, n. 107, p. 591–593, 2006.

KANCHANATAWAN, B. et al. Towards a new classification of stable phase schizophrenia into major and simple neuro-cognitive psychosis: Results of unsupervised machine learning analysis. *Journal of Evaluation in Clinical Practice*, v. 24, n. 4, p. 879-91, 2018.

KAPPOS, L. et al. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurology*, n. 6, p. 431-444, 2007.

KAVAK, K. S. Higher weight in adolescence and young adulthood is associated with an earlier age at multiple sclerosis onset. *Multiple Sclerosis*, v. 21, p. 858-865, 2015.

KAWAJIRI, M. et al. Reduction of angiotensin II in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, v. 14, n. 4, p. 557-560, 2008.

KEEGAN, M. et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutics plasma exchange. *Lancet*, n. 366, v. 9485, p. 579-582, 2005.

KIM, W. et al. Oral disease-modifying therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neurology*, v. 11, n. 1, p. 9-19, 2015.

KIVISÄKK, P. et al. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.100, n. 14, p. 8389–8394, 2003.

KNOPMAN, D. S. et al. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: Cardiovascular risk factors and cerebral atrophy in a middleaged cohort. *Neurology*, v. 65, p. 876 – 881, 2005.

KOCH, M. et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, v. 14, p. 529-533, 2007a.

KOCH, M. et al. Progression in multiple sclerosis: Further evidence of an age dependent process. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 255, p. 35–41, 2007b.

KORTEM, K. M. M. Multiple Sclerosis: New insights and trends. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6 (5): 429-440, 2016.

KUBICKA-BACZYK, K., et al. Calcium–phosphate metabolism in patients with multiple sclerosis. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 38, n. 6, p. 635–642, 2015.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, v. 33, p. 1444-1452. 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.

LOSSIUS, A. et al. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells. *European Journal of Immunology*, v. 44, p. 3439–3452, 2014.

LOUVEAU, A. et al. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, v. 523, p. 337–341, 2015.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, v. 46, n. 4, p. 907-911, 1996.

LUBLIN, F. D.; BAIER, M.; CUTTER, G. Effect of relapses on development of residual deficit in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 61, n. 11, p. 1528-32, 2003.

LUBLIN, F. D. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. *Neurology*, v. 83, n. 3, p. 278–286, 2014.

MAJUMDAR, A.; MANGAL, N. S. Hyperprolactinemia. *Journal of Human Reproductive Sciences*, v. 6, n. 3, p. 168–175, 2013.

MARONGIU, E. et al. Metaboreflex activity in multiple sclerosis patients. *European Journal of Applied Physiology*, v. 115, p. 2481-2490, 2015.

MARQUES, J. P. Esclerose Múltipla- Formas e fases da doença. In: PEDROSA, R. **Introdução à Esclerose Múltipla**: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1ª Edição. Lisboa: Biogen Indec, 2010, p. 155-61.

MARQUES, V. D. 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, n. 8, p. 539-554, 2018.

MARRIE, R. A.; HORWITZ, R. I. Emerging effects of comorbidities on multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, v. 9, p. 820-828, 2010.

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

MARRIE, R. A. et al. Association between comorbidity and clinical characteristics of MS. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 124, p. 135–141, 2011.

MARTINELLI, V. et al. Vitamin D levels and risk of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Multiple Sclerosis*, v. 20, n. 2, p. 147-155, 2013.

MCCMAHON, E. J. et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, v.11, p. 335–339, 2005.

MELLAI, M. et al. Prolactin and prolactin receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Human Immunology*, v. 64, n. 2, p. 274-84, 2003.

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

MILLER, A. E. et al. Pre-specified subgroup analyses of a placebo-controlled phase III trial (TEMPO) of oral teriflunomide in relapsing multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 18, n. 11, p. 1625-1632, 2012b.

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, p. 1802–1805, 2013.

MOREIRA, M. A. et al. Consenso Expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla. II. As evidências para o uso de glicocorticóides e imunomoduladores. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 60, p. 875-880, 2002.

MUENZ, C. et al. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*, v. 9, p. 246–258, 2009.

NAIDOO, R.; KNAPP, M. L. Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clinical Chemistry*, v. 38, p. 2449–2454, 1992.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical Chemistry*, v. 44, p. 679–81, 1998.

NOSEWORTHY, J. H. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature*, v. 399, p. 40-47, 1999.

NOSEWORTHY, J. H. et al. Multiple sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, v. 343, p. 938-951, 2000.

NOSEWORTHY, J.; CONFAVREUX, C.; COMPSTON, A. Treatment of the acute relapse. In: COMPSTON, A. et al. (Org.). *McAlpine's Multiple Sclerosis*. 4.ed. New York: Churchill Livingstone, 2006. p. 683-699.

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, 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, p. 268–73, 2014.

OLIVEIRA, S. R. et al. Vitamin D deficiency is associated with disability and disease progression in multiple sclerosis patients independently of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Neurological Sciences*, v. 381, p. 213-9, 2017.

OLIVEIRA, S. R. et al. Elevated plasma homocysteine levels are associated with disability progression in patients with multiple sclerosis. *Metabolic Brain Disease*, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-018-0224-4>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

O'CONNOR, P. W. et al. A Phase II study of the safety and efficacy of teriflunomide in multiple sclerosis with relapses. *Neurology*, v. 66, n. 6, p. 894-900, 2006.

OLSON, J. K. et al. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 108, p. 311–318, 2001.

ORTIZ, G. G. et al. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/708659>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

ORTIZ, G. G., et al. Multiple Sclerosis and Its Relationship with Oxidative Stress, Glutathione Redox System, ATPase System, and Membrane Fluidity. *Trending Topics in Multiple Sclerosis*, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/64737>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

OVERS, S. et al. Modifiable comorbidities and disability in multiple sclerosis. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, v. 12, n. 5, p. 610-617, 2012.

PANIS, C. et al. Trypanosoma cruzi: Effects of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice. *Experimental Parasitology*, v. 127, p. 58-65, 2011.

PENNER, I. K.; CALABRESE, P. Managing fatigue: clinical correlates, assessment procedures and therapeutic strategies. *The International MS Journal*, v. 17, n. 1, p. 28-34, 2010.

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.

PITTAS, F. et al. Smoking is associated with progressive disease course and increased progression in clinical disability in a prospective cohort of people with multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, v. 256, p. 577-585, 2009.

PITTOCK, S. J.; RODRIGUEZ, M. Benign multiple sclerosis: a distinct clinical entity with therapeutic implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v. 318, p. 1-17, 2008.

PLOSKER, G. L. Interferon-b-1b. A Review of its Use in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, v. 25, n. 1, p. 67-88, 2011.

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.

POPESCU, B. F.; LUCCHINETTI, C. F. Pathology of demyelinating diseases. *Annual Review of Pathology*, v.7, p. 185–217, 2012.

POSER, S.; BAUER, H. J.; POSER, W. Prognosis of multiple sclerosis. Results from an epidemiological area in Germany. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 65, n. 4, p. 347-354, 1982.

RAMAGOPALAN, S. V.; DYMENT, D. A.; EBERS, G. C. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends in Neuroscience*, v. 31, p. 645– 652, 2008.

RANSOHOFF, R. M.; ENGELHARDT, B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 9, p. 623-635, 2012.

REPETTO, M., et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinical Chimica Acta*, v. 255, p. 107-117, 1996.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: Spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 357–63, 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, 2011.

RICHTER, B. et al. Body mass index correlates with multiple sclerosis disease and symptom severity in women, but not in men. *Neurological Disorders Therapeutics*, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2017

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.

ROSHANISEFAT, H. et al. Multiple sclerosis clinical course and cardiovascular disease risk: Swedish cohort study. *European Journal of Neurology*, v. 21, n. 1353-1388, 2014.

ROVARIS, M. et al. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *The Lancet Neurology*, v. 5, n. 4, p. 343-354, 2006.

ROXBURGH, R. H. et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*, v. 64, n. 7, p. 1144-1151, 2005.

SÁ, M. J. Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 70, n. 9, p. 733-740, 2012.

SAARI, A. et al. Cardiovascular autonomic dysfunction correlates with brain MRI lesion load in MS. *Clinical Neurophysiology*, v. 115, p. 1473-1478, 2004.

SAVINO, W. Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease. *Frontiers of Hormone Research*, VOL 48, P. 69–75, 2017.

SAWCER, S. et al. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, v. 476, p. 214-9, 2011.

SAYRE, L. M.; PERRY, G.; SMITH, M. A. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, p. 172-188, 2008.

SCALFARI, A. et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*, v. 133, p. 1914-1929, 2010.

SCALFARI, A. et al. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 85, n. 1, p. 67-75, 2014.

SELLEBJERG, F. et al. Acute relapses of multiple sclerosis. In: Gilhus, N. E. et al. (Org). **European Handbook of Neurological Management**, v. 1, Blackwell Publishing, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/9781444328394.ch27>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

SHEREMATA, W.; BROWN, A. D.; RAMMOHAN, K. W. Dimethyl fumarate for treating relapsing multiple sclerosis. *Expert Opinion Drug Safety*, v. 14, n. 1, p. 161-170, 2015.

SINHA, Y. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, v. 16, p. 354–69, 1995.

SIPE, J. C. et al. A neurologic rating scale (NRS) for use in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 34, n. 10, p. 1368-1372, 1984.

SITIA, S. et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity Reviews*, v. 9, p. 830-834, 2010.

SNOWDEN, J. A. et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: updated guidelines of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v. 47, n. 6, p. 770-790, 2012.

SNYDER, C. M. et al. Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. *Immunity*, v. 29, p. 650–659, 2008.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. *Annual Review Immunology*, v. 23, p. 683–747, 2005.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, v. 36, p. 115–27, 2016.

STEIN, M. S. et al. Dysequilibrium of the PTH-FGF23-vitamin D axis in relapsing remitting multiple sclerosis: a longitudinal study. *Molecular Medicine*, v. 24, n. 1, p. 27, 2018.

STELMASIAK, Z. et al. IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients. *Medical Science Monitor*, v. 7, p. 914-918, 2001.

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

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. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurology*, v. 17, p. 162-73, 2018.

TINTORE, M.; VIDAL-JORDANA, A.; SASTRE-GARRIGA, J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nature Reviews Neurology*, v. 15, n.1, p. 53-58, 2019.

TOMIO, A. et al. Prolactin can modulate CD4+ T-cell response through receptor-mediated alterations in the expression of T-bet. *Immunology & Cell Biology*, v. 86, n. 7, p. 616–21, 2008.

TRAPP, B. D.; NAVE, K. A. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual Review of Neuroscience*, v. 31, p. 247-269, 2008.

TÜRKOĞLU, R. et al. Serum prolactin levels in Multiple sclerosis, neuromyelitis optica, and clinically isolated syndrome patients. *Nöropsikiyatri Arşivi*, v. 53, n. 4, p. 353-356, 2016.

VENTURINI, D. et al. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity*, v. 20, n. 12, p. 2361-2366, 2012.

VERA-LASTRA, O.; JARA, L. J.; ESPINOZA, L. R. Prolactin and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v.1, n. 6, p.360–4, 2002.

VIATTE, S. et al. Replication of associations of genetic loci outside the HLA region with susceptibility to anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, v. 68, n. 7, p. 1603–13, 2016.

VERSINI, M. et al. Obesity in autoimmune diseases: not a passive bystander. *Autoimmunity Reviews*, v. 13, p. 981-1000, 2014.

WALTON, P. E; CRONIN, M. J. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma reduce prolactin release in vitro. *American Journal of Physiology*, 1990.

WARNKE, C. et al. Review of teriflunomide and its potential in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 5, p. 333-340, 2009.

WATSON, G. S.; CRAFT, S. Insulin resistance, inflammation, and cognition in Alzheimer's disease: lessons for multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 245, p. 21-33, 2006.

WEISHENKER, B. G. et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study - 2 predictive value of the early clinical course. *Brain*, v. 112, n. 6, p. 1419-1428, 1989.

WEINSTOCK-GUTTMAN, et al. Serum lipid profiles are associated with disability and MRI outcomes in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-8-127>>. Acesso em: 20 fev. 2018.

WENS, I. et al. Risk factors related to cardiovascular diseases and the metabolic syndrome in multiple sclerosis - a systematic review. *Multiple Sclerosis*, v. 19, n. 1556-1564, 2013.

WINGERCHUK, D. M. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, v. 5, n. 1, p. 13-22, 2012.

WITKO-SARSAT, V. et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *The Journal of Immunology*, v. 161, p. 2524-32, 1998.

YAMASHITA, T. et al. Changes in nitrite and nitrate (NO₂/NO₃-) levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 153, n. 1, p. 32-34, 1997.

YSRRAELIT, M.C.; CORREALE, J. Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology*, v. 156, n. 1, p. :9-22, 2019.

YUCEYAR, N.; TASKIRAN, D.; SAGDUYU, A. Serum and cerebrospinal fluid nitrite and nitrate levels in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 103, p. 206-211, 2001.

ZIVADINOV, R. et al. Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 73, p. 504-510, 2009.

ŽIVKOVIĆ, M. et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms as risk factors for multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 363, p. 29-32, 2016.

9 ANEXO

ANEXO A – Parecer aprovação do CEP/UEL



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

Parecer CEP/UEL:	250/2013
CAAE:	22290913.9.0000.5231
Data da Relatoria:	17/03/2014
Pesquisador(a):	Edna Maria Vissoci Reiche
Unidade/Órgão:	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



10 APÊNDICES

APÊNDICE A – TCLE

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 (Profª Drª Edna Maria Vissoci Reiche ou Profª Drª 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 Projeto EM

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