



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA PAULA KALLAUR

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI* DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL β , MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO E
NITROSATIVO COMO PREDITORES DA INCAPACIDADE,
PROGRESSÃO DA DOENÇA E DEPRESSÃO NA ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

ANA PAULA KALLAUR

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO *NcoI* DO
FATOR DE NECROSE TUMORAL β , MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO E
NITROSATIVO COMO PREDITORES DA INCAPACIDADE,
PROGRESSÃO DA DOENÇA E DEPRESSÃO NA ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche

Co-orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Londrina
2017

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

Kallaur, Ana Paula.

Avaliação do polimorfismo genético Ncol do fator de necrose tumoral ?, marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo como preditores da incapacidade, progressão da doença e depressão na esclerose múltipla / Ana Paula Kallaur. - Londrina, 2017.
89 f. : il.

Orientador: Edna Maria Vissoci Reiche.

Coorientador: Andréa Name Colado Simão.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Esclerose múltipla - Tese. 2. Polimorfismo (Genética) - Tese. 3. Fator de necrose de tumor - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Reiche, Edna Maria Vissoci. II. Simão, Andréa Name Colado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

ANA PAULA KALLAUR

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO *NCOI* DO *FATOR DE NECROSE TUMORAL β*, MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DO ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO COMO PREDITORES DA INCAPACIDADE, PROGRESSÃO DA DOENÇA E DEPRESSÃO NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

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

Londrina, 07 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Jeisemar, que me apoia nos momentos difíceis, me incentiva e dá forças para continuar a estudar e concluir mais uma etapa;

Aos meus pais e irmãs, por todo apoio que me deram durante todos os anos de estudo;

À minha orientadora Professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche por todos os ensinamentos, além do carinho e atenção que me deu durante a nossa longa caminhada juntas;

À minha co-orientadora Professora Dra. Andréa Name Colado Simão pelo incentivo e ensinamentos;

Ao Professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel pela dedicação ao projeto de pesquisa e atendimento aos pacientes e por todo apoio e atenção aos pós-graduandos que participaram do estudo;

Um agradecimento especial aos residentes Paula Raquel do Vale Pascoal Rodrigues, Lucas José Vaz Schiavão e Danilo Grotii, que facilitaram muito nosso trabalho junto aos pacientes;

A toda a equipe de trabalho, Dra. Elaine Regina Delicato de Almeida, Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy, Dra. Helena Kaminami Morimoto, Sayonara Rangel Oliveira, Wildea Lice Jennings de Carvalho Pereira, Daniela Frizon Alfieri, Francieli Delongui e Tamires Flauzino, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários dos Setores de Imunologia Clínica, Diagnóstico Molecular e de Coletas do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UEL, pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos docentes e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelo apoio;

À Pro-Reitoria de Pesquisa e Pósgraduação da UEL pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UEL,

À Fundação Araucária pelo apoio financeiro aos Projetos de Pesquisa Básica e Aplicada;

Aos pacientes que, voluntariamente, participaram do projeto de pesquisa que norteou este estudo, pela confiança na equipe de pesquisadores e entendimento da importância da realização deste estudo.

KALLAUR, Ana Paula. **Avaliação do polimorfismo genético *NcoI* do fator de necrose tumoral β , marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo como preditores da incapacidade, progressão da doença e depressão na esclerose múltipla.** 2017. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Introdução: Existem evidências de que mecanismos inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo exercem importante papel na fisiopatologia da esclerose múltipla (EM) e depressão. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo genético *NcoI* do fator de necrose tumoral (*TNF*)- β (rs909253), marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo (IO&NS) como preditores da incapacidade neurológica, progressão da doença e presença de depressão em pacientes com EM. **Métodos:** Inicialmente, foi realizado um delineamento caso-controle com 212 pacientes com EM (150 mulheres e 62 homens), sendo 150 com a forma clínica remitente recorrente (EMRR) e 61 com as formas progressivas. Posteriormente, foi realizado um estudo longitudinal com seguimento ambulatorial durante 5 anos. Como controle, foram inseridos 249 indivíduos saudáveis (170 mulheres e 72 homens). O diagnóstico de EM foi realizado segundo os critérios revisados de McDonald; a incapacidade neurológica foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) em 2006 e 2011 e os pacientes foram divididos com incapacidade leve (EDSS < 3) e moderada ou grave (EDSS \geq 3). A progressão da doença foi avaliada pelo aumento do EDSS no período de estudo e pela diferença entre os valores de EDSS obtidos em 2006 e 2011 (Δ EDSS). A atividade da doença foi avaliada pela presença de lesões gadolínio-positivas observadas na ressonância magnética nuclear (RMN). A depressão foi avaliada pela Escala de Depressão e Ansiedade do Hospital (HADS), sendo considerado paciente com depressão quando o escore > 8,0. A dependência de nicotina foi identificada pelos critérios revisados do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais. O polimorfismo genético *NcoI* do *TNF*- β foi determinado pela reação em cadeia da polimerase e polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (PCR-RFLP) com a identificação de 3 genótipos: GG (TNB1/B1), GA (TNFB1/B2) e AA (TNFB2/B2). Foram avaliados os níveis séricos da interleucina (IL)-1 β , IL-6, TNF- α , interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-10, IL-17, proteína C reativa (PCR), albumina e ferritina. Foram determinados os níveis plasmáticos de hidroperóxido (CL-LOOH), proteínas carbonílicas, produtos avançados da oxidação de proteínas (AOPP), metabólitos do óxido nítrico (NOx) e a capacidade total antioxidante do plasma. **Resultados:** A média (\pm desvio-padrão) do EDSS em 2006 foi $1,62 \pm 2,01$ e em 2011 foi $3,16 \pm 2,29$ e a duração da doença foi de $7,34 \pm 7,0$ anos. Os níveis de IL-10, TNF- α , IFN- γ , AOPP e NOx foram mais elevados e os de IL-4 foram menores em pacientes com EDSS ≥ 3 comparados aos obtidos em pacientes com EDSS < 3, quando avaliados em 2011 ($p=0,05$). O aumento do EDSS no período 2006-2011 foi positivamente associado aos níveis de TNF- α e IFN- γ . Níveis aumentados de IFN- γ foram associados aos sintomas piramidais ($p=0,041$) e níveis aumentados de IL-6 foram associados a sintomas sensitivos ($p=0,029$). Níveis aumentados de proteínas carbonílicas e IL-10, assim como níveis diminuídos de albumina mostraram-se preditores dos sintomas cerebelares ($p=0,012$, $p=0,036$ e $p=0,017$, respectivamente). O genótipo GA (TNFB1/B2) do polimorfismo *NcoI* do *TNF*- β foi associado com menor risco de progressão dos sintomas piramidais ($p=0,010$). O tratamento com IFN- β e acetato de glatiramer reduziu os níveis de TNF- α mas não alterou os outros biomarcadores de

IO&NS e progressão da doença. Níveis aumentados de IL-6 e diminuídos de IL-4 e albumina foram associados com a presença de depressão nos pacientes com EM ($p=0,003$, $p=0,044$ e $p=0,013$, respectivamente). A regressão logística binária mostrou que pacientes EM com depressão (*versus* sem depressão) apresentaram mais sintomas intestinais e progressão da doença, níveis aumentados de IL-6 e diminuídos de albumina ($p=0,001$, $p=0,003$, $p=0,010$ e $p=0,041$, respectivamente). Em indivíduos com EM, a presença de sintomas piramidal, intestinal e visual foram preditores dos escores de HADS; 58,0% da variação no HADS foram devidas a sintomas intestinais e visuais, assim como negativamente associados ao genótipo GA (TNFB1/B2) e lesões gadolínio-positivas na RMN. **Conclusão:** Os marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo (IO&NS) e o genótipo GA (TNFB1/B2) do polimorfismo *NcoI* do *TNF- β* foram preditores de maior incapacidade na EM e associados com diferentes índices da progressão da doença, quando avaliada pelo EDSS e sintomas específicos, incluindo progressão dos sintomas piramidais, sensitivos e cerebelares. Como os medicamentos modificadores da atividade da doença utilizados pelos pacientes não afetaram os biomarcadores do estresse oxidativo e nitrosativo e que estes biomarcadores foram preditores da progressão da doença, estes resultados sugerem que novos tratamentos da EM podem ter como alvo as vias do estresse oxidativo e nitrosativo. Outra conclusão importante do estudo é que a EM com depressão está associada com sinais de inflamação periférica, maior incapacidade, progressão da doença, sintomas intestinais e visuais, mas com menor atividade aguda da doença avaliada pela presença de lesões gadolínio-positivas quando comparada com EM sem depressão. Estes resultados sugerem que a depressão é parte dos sintomas neurológicos da EM e que o aparecimento deste sintoma é influenciado pela inflamação periférica enquanto neuroinflamação aguda e o genótipo GA (TNFB1/B2) parecem desencadear papel protetor para o aparecimento dos sintomas depressivos.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Polimorfismo genético. Fator de necrose tumoral β . Citocinas. Estresse oxidativo e nitrosativo. EDSS. Inflamação. Depressão.

KALLAUR, Ana Paula. **Evaluation of tumor necrosis factor β *NcoI* polymorphism, inflammatory, oxidative and nitrosative biomarkers as predictors of disability, progression of disease and depression in multiple sclerosis.** 2017. 89 p. Thesis (Doctoral in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Background: There is evidence that activated immune inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways play a role in the pathophysiology of multiple sclerosis (MS) and depression. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the *NcoI* of the tumor necrosis factor (*TNF*)- β polymorphism (rs909253), inflammatory markers and oxidative and nitrosative stress biomarkers (IO&NS) as predictors of disability, disease progression and depression in MS patients. **Methods:** Firstly, a case-control study was carried out with 212 MS patients with MS (150 women e 62 men), 150 presenting relapsing-remitting MS (RRMS) and 61 presenting progressive forms. Secondly, a longitudinal and 5-years follow-up was carried out with 249 healthy controls (170 women and 72 men). Revised McDonald Criteria were used in diagnosis; the disability was measured using Expanded Disability Status Scale (EDSS) in 2006 and 2011 and the patients were categorized as mild disability (EDSS < 3) and moderate/severe disability (EDSS \geq 3). The progression was evaluated using the increases in EDSS scores during the study and the delta values of the 5-years follow up (Δ EDSS = 2011 EDSS - 2006 EDSS). The disease activity was evaluated using gadolinium-enhanced lesions in magnetic resonance imaging (MRI). Depression was evaluated using Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) and was defined when scores were > 8.0. The nicotine dependence was evaluated according Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision. The *NcoI TNF*- β polymorphism was determined using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), and three genotypes were identified: GG (TNB1/B1), GA (TNGB1/B2) and AA (TNFB2/B2). Serum levels of interleukin (IL)-6, TNF- α , interferon (IFN)- γ , IL-4, IL-10, and IL-17, albumin, ferritin, and plasma levels of lipid hydroperoxides (CL-LOOH), carbonyl protein, advanced oxidation protein products (AOPPs), nitric oxide metabolites (NOx), and total antioxidant plasma capacity were also evaluated. **Results:** The mean EDSS (\pm standard deviation) in 2006 was 1.62 ± 2.01 and in 2011 3.16 ± 2.29 , and disease duration was 7.34 ± 7.0 years. The levels of IL-10, TNF- α , IFN- γ , AOPP, and NOx were significantly higher and IL-4 were lower in MS patients with higher 2011 EDSS scores (≥ 3) as compared with those with low EDSS < 3 scores ($p < 0.05$). The actual increases in EDSS from 2006 to 2011 were positively associated with TNF- α and IFN- γ . Increased IFN- γ values were associated with higher pyramidal symptoms ($p = 0.041$) and increased IL-6 with sensitive symptoms ($p = 0.029$). Increased carbonyl protein and IL-10 but lowered albumin levels predicted cerebellar symptoms ($p = 0.012$, $p = 0.026$, and $p = 0.017$, respectively). The GA (TNFB1/B2) genotype decreased risk towards progression of pyramidal symptoms ($p = 0.010$). Treatment with IFN- β and glatiramer acetate significantly reduced TNF- α but did not affect the other IO&NS biomarkers or disease progression. Three variables discriminate MS patients with depression from those without depression, i.e., increased IL-6 and lower IL-4 and albumin ($p = 0.003$, $p = 0.044$ and $p = 0.013$, respectively). Binary logistic regression showed that MS with depression (*versus* MS without depression) was characterized by more intestinal symptoms and disease progression, higher serum IL-6, and lower albumin levels ($p = 0.001$, $p = 0.034$, $p = 0.010$, and $p = 0.041$, respectively). In patients with MS, the HADS score was significantly predicted by three EDSS symptoms,

i.e., pyramidal, intestinal, and visual symptoms. Fifty-eight percent of the variance in the HADS score were predicted by intestinal symptoms, visual symptoms, the GA (TNFB1/B2) genotype, and gadolinium-positive enhancement lesions (both inversely associated). **Conclusion:** The inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) biomarkers and GA (TNFB1/B2) genotype of *NcoI TNF- β* genotypes predict high disability in MS and are associated with different aspects of disease progression, when evaluated by EDSS and specific symptoms, including progression of pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms. As the disease modifying drugs of the patients did not affect the oxidative stress biomarkers and these biomarkers were predictors of the disease, this result suggests that new drugs to treat MS should also target oxidative stress pathways. Another conclusion MS with depression is associated with signs of peripheral inflammation, more disability, disease progression, intestinal and visual symptoms, but less gadolinium-positive lesions as compared to MS without depression. It is concluded that depression is part of the neurological symptoms of MS and that its expression is primed by peripheral inflammation while acute neuroinflammation and the GA (TNFB1/B2) genotype may be protective.

Keywords: Multiple sclerosis. Genetic polymorphism. Oxidative and nitrosative stress. Tumor necrosis factor beta. EDSS. Inflammation. Depression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
AOPP	<i>Advanced oxidatin protein products</i> (Produtos avançados de oxidação proteica)
APCs	<i>Antigen presenting cells</i> (Células apresentadoras de antígenos)
AU	Ácido úrico
BCR	<i>B cell receptors</i> (Receptores de células B)
BHE	Barreira hematoencefálica
CIS	<i>Clinicaly isolated syndrome</i> (Síndrome clinicamente isolada)
CL-LOOH	<i>T-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence</i> (quimioluminescência iniciada por terc-butil hidroperóxido)
CMIA	<i>Chemiluminescence microparticle immunoassay</i> (Imunoensaio de quimioluminescência de micropartícula)
DNA	<i>Desoxiribunucleic acid</i> (Ácido desoxiribonucleico)
dNTP	<i>Deoxynucleotide</i> (Deoxinucleotídeo)
DP	Desvio padrão
DSM IV-TR	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision</i> (Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais)
DTNB	Ácido 2,2 ditiobisnitrobenzóico
EAE	<i>Experimental autoimmune encephalomyelitis</i> (Encefalomielite autoimune experimental)
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida do Estado de Incapacidade)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiaminotetracético)
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLM	<i>Multivariate general linear model</i> (Análise multivariada linear)
GWAS	<i>Genome-wide association studies</i> (Estudos genômicos de associação)
HADS	<i>Hospital Anxiety and Depression Scale</i> (Escala de Depressão e Ansiedade)

HU	Hospital Universitário
IC	Intervalo de confiança
IFN- β	Interferon β
IL	Interleucina
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i> (Óxido nítrico sintase induzível)
IO&NS	<i>Inflammatory, oxidative and nitrosative stress</i> (Inflamação e estresse oxidativo e nitrosativo)
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LB	Linfócito B
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LT	Linfócito T
LT CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
MBP	<i>Myelin basic protein</i> (Proteína básica da mielina)
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i> (Metaloproteinase de matrix)
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i> (Glicoproteína oligodendrocítica da mielina)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> . Centro Nacional de Informação Biotecnológica
Nfr2	<i>Nuclear factor erythroid 2- related transcription factor</i> (Fator de transcrição nuclear E2 relacionado) Nuclear Factor Erythroid 2 (NF-E2)-Related Transcription Factor
NO	<i>Nitric oxide</i> (Óxido nítrico)
NO _x	<i>Nitric oxide metabolites</i> (Metabólitos do óxido nítrico)
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
N ₂ O ₃	Trinitrigem trióxido
N ₃ O ₄	Trinitrigem tetroxido

ONOO	Peroxinitrito
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (Células mononucleares do sangue periférico)
PCR	Proteína C reativa
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PLP	<i>Proteolipid protein</i> (Proteína proteolipídica)
P-SH	Grupo tiol das proteínas
QL	Quimioluminescência
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i> (Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição)
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA _m	<i>Ribonucleic acid messenger</i> (Ácido ribonucléico mensageiro)
S1P	<i>Sphingosine 1 phosphate</i> (Fosfato de esfingosina-1)
S1PR	<i>Sphingosine 1 phosphate receptor</i> (Receptor de fosfato de esfingosina-1)
SOD	Superóxido dismutase
SNC	Sistema nervoso central
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismo de um único nucleotídeo)
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor</i> α (Fator de necrose tumoral α)
TRAP	<i>Total Radical Trapping Antioxidant Parameter</i> (Parâmetro antioxidante relacionado à captura total de radicais)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta
VCAM	<i>Vascular cellular adhesion molecule</i> (Molécula da adesão celular vascular)
VLA4	<i>Very late antigen 4</i> (Antígeno muito tardio 4)

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Fisiopatologia da Esclerose Múltipla	3
1.2 Citocinas na Esclerose Múltipla	5
1.3 Polimorfismo genético NcoI do fator de necrose tumoral beta	8
1.4 Estresse oxidativo e nitrosativo	10
1.5 Depressão na esclerose múltipla	14
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
4. METODOLOGIA	19
4.1 Comitê de Ética	19
4.2 Delineamento	19
4.3 População	19
4.4 Amostra	19
4.5 Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos	20
4.6 Avaliação da Depressão	21
4.7 Avaliação da dependência de nicotina	21
4.8 Medicamentos para o tratamento da esclerose múltipla	21
4.9 Coleta de sangue	22
4.10 Polimorfismo genético NcoI do TNF- β	22
4.11 Biomarcadores inflamatórios e anti-inflamatórios	23
4.12 Biomarcadores do estresse oxidativo	24

4.12.1	Capacidade Antioxidante Total do Plasma (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter, TRAP)	24
4.12.2	Determinação de hidroperóxidos lipídicos iniciados por t-butil (CL-LOOH)	24
4.12.4	Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)	25
4.12.5	Determinação de proteínas carbonílicas	25
4.13	Análise Estatística	25
5.	RESULTADOS	25
	Artigo 1	269
	Artigo 2	43
6	CONCLUSÃO	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
	REFERENCIAS	56
	ANEXOS E APÊNDICES	74
	ANEXO A: Parecer do Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da UEL	74
	APENDICE A: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes com Esclerose Múltipla	75
	ANEXO B: Questionário Projeto EM	86

1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante inflamatória crônica progressiva do sistema nervoso central (SNC), caracterizada por lesões imuno-mediada das células na substância branca e cinzenta do cérebro, medula espinhal e nervo óptico (KAMALI-SARVESTANI et al., 2007). Afeta, principalmente, jovens adultos do sexo feminino (MOUZAKI et al., 2015).

A patogênese da EM não está completamente elucidada e evidências demonstram uma complexa interação entre susceptibilidade genética, falha dos mecanismos de tolerância imunológica e fatores ambientais como gatilho (MOUZAKI et al., 2015), assim como interações entre genes e meio ambiente e mecanismos epigenéticos (VOSKUHL e GOLD, 2012). Entre os fatores ambientais estão as infecções virais (principalmente envolvendo o vírus Epstein Barr), agentes químicos, tabaco, dieta (obesidade) e vitamina D (baixa exposição solar) (GRIGORIADIS e VAN PESCH, 2015).

O diagnóstico da EM é baseado em evidências clínicas, exame de ressonância magnética nuclear (RMN), exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) e os potenciais evocados. Para estabelecer o diagnóstico de EM, deve demonstrar a ocorrência de lesões no SNC disseminadas no tempo e no espaço e excluir qualquer outro diagnóstico. Os critérios diagnósticos utilizados são os de Poser (1991), McDonald (2001), McDonald revisados em 2005 (WOLINSKY, 2005) e em 2010 (POLMAN et al., 2010). No entanto, esta nova revisão não invalida os critérios de McDonald publicados em 2001 e 2005 (POLMAN et al., 2010). Estas revisões foram realizadas para classificar exatamente o significado de surto, disseminação da doença no espaço e no tempo, RMN positiva e caracterizar a síndrome clinicamente isolada (CIS). A forma CIS caracteriza-se por manifestações agudas monofásicas em localizações anatômicas específicas: neurite óptica, nas regiões justacortical, periventricular e infratentorial, mielite transversa, tronco cerebral e cerebelo, indicativas de alto risco para desenvolver a doença clinicamente definida, quando está associada à presença de lesões na RMN e às alterações imunológicas no LCR atribuídas à EM (POLMAN et al., 2005; KANTARCI et al., 2005; WHO, 2006). O critério de McDonald foi revisado em 2010, para facilitar o diagnóstico de EM e diferenciar do diagnóstico de neuromielite óptica.

Além da forma CIS, a EM ainda possui as formas clínicas recorrente-remitente (EMRR), primariamente progressiva (EMPP) e secundariamente progressiva (EMSP). A forma EMRR é a mais frequente, caracterizada por episódios de surtos bem definidos no tempo, com alteração de uma ou mais funções neurológicas, com posterior recuperação que pode ser completa ou com sequelas. Cerca de 70,0 a 80,0% dos pacientes apresentam esta forma clínica (VALE, 2010). A EMSP caracteriza-se pela progressão contínua da doença, sem a presença de surtos e acomete cerca de 15,0 a 20,0% dos pacientes. Aproximadamente, 50,0% dos pacientes com a EMRR irão desenvolver a forma EMSP dentro de 10 anos e 80,0% irão desenvolver dentro de 20 anos após o início da doença. A EMPP é a forma mais grave da doença e também a menos frequente e acomete 10,0 a 15,0% dos pacientes e

caracteriza-se por uma progressão desde o início da doença. A forma primária progressiva recorrente (EMPPR) é caracterizada pelo início progressivo surgindo posteriormente surtos bem identificados, mantendo um padrão de progressão entre os surtos. Esta forma constitui cerca de 5% dos casos e parece ser a evolução natural da forma clínica EM-PP (MARQUES, 2010). O termo progressão em EM significa um agravamento contínuo dos sinais neurológicos no SNC por um período mínimo de 6 meses. Pacientes que manifestam as formas progressivas da EM (EMSP e EMPP) apresentam um pior prognóstico, pois não apresentam uma boa resposta terapêutica aos medicamentos disponíveis (VALE, 2010; FARJAM et al., 2015). As opções terapêuticas para estes pacientes são limitadas e, na maioria das vezes, ineficazes. A figura 1 ilustra as formas clínicas da EM.

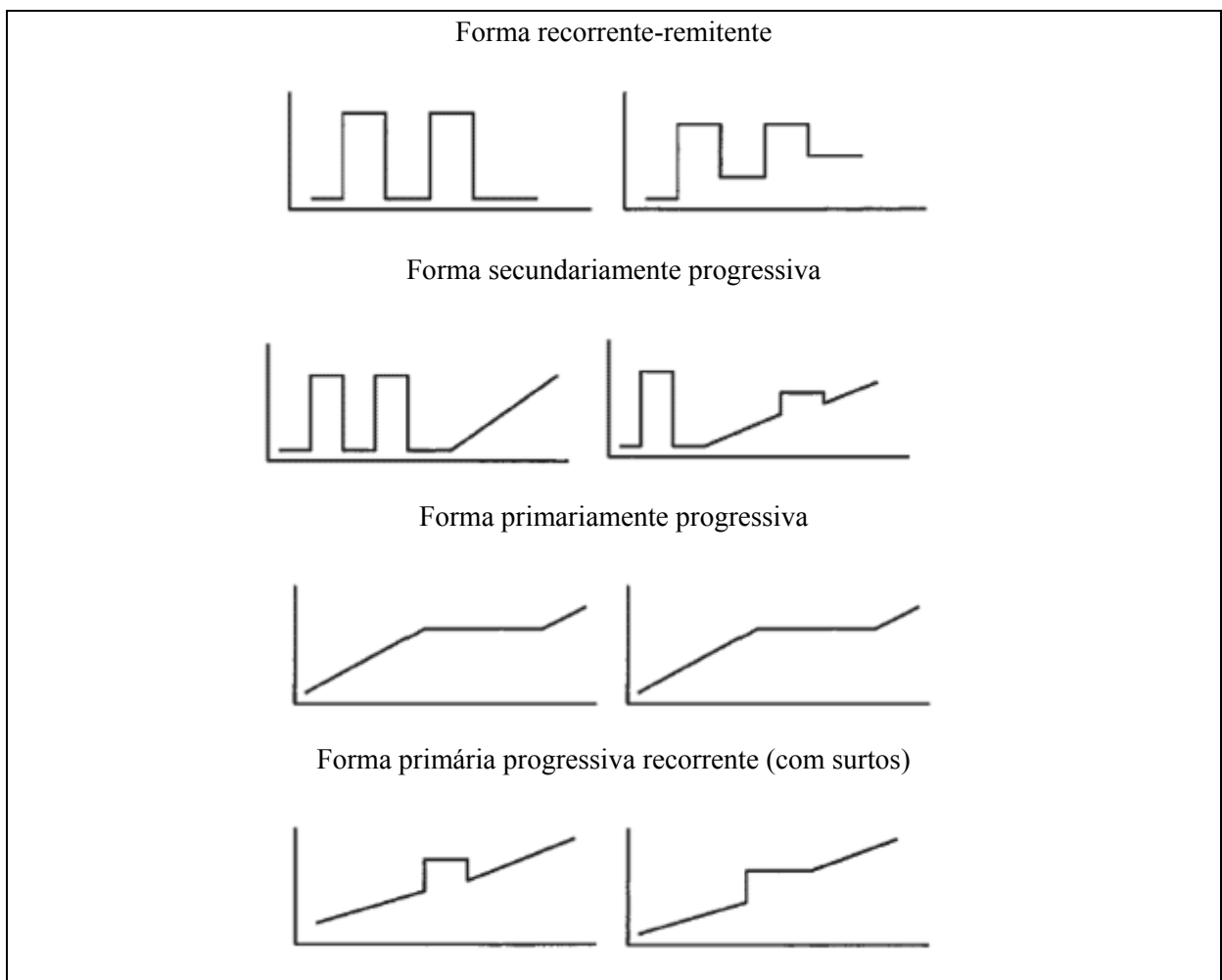


Figura 1. Representação gráfica das formas clínicas da esclerose múltipla. Fonte: MARQUES (2010)

A gravidade da EM pode ser avaliada por marcadores de inflamação e desmielinização observados no exame de RMN que pode revelar uma lesão captante do contraste gadolínio e pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (*Expanded Disability Status Scale - EDSS*) de Kurtzke (1983). Na EDSS, os escores variam de 0,0 (nenhuma incapacidade) a 10,0 (morte devido à EM) dependendo do comprometimento dos sistemas funcionais apresentado pelo paciente. Entre os

sistemas funcionais avaliados nesta escala estão as funções piramidal, cerebelar, do tronco cerebral, sensitiva, vesical, intestinal, visual, cerebral ou mentais.

A técnica de RMN tem sido amplamente utilizada para entender a fisiopatologia da EM, demonstrando danos tanto na substância branca quanto na cinzenta, lesões estas que contribuem para o aumento da incapacidade neurológica (MORGEN et al., 2006; PIRKO et al., 2007). Um estudo de nove anos de seguimento em pacientes com EM mostrou atrofia significativa nas substâncias branca e cinzenta, avaliada pela RMN. Os pacientes com EMSP tiveram maior atrofia na substância cinzenta e maior carga lesional do que os com EMRR, que foram relacionadas significativamente com a EDSS e idade de início da doença (TEDESCHI et al., 2005). Estes autores concluíram que a atrofia da substância cinzenta é a variável mais significativa para determinar a incapacidade final do paciente. Kearney et al. (2016) mostraram que atrofia na medula espinhal e no cérebro são relevantes, contribuindo independentemente para o aumento da incapacidade.

O cerebelo é o local de maior dano na EM, principalmente em pacientes com as formas progressivas (CALABRESE et al., 2010; REDONDO et al., 2015; KEMP et al., 2016). A alteração cerebelar contribui para a incapacidade neurológica, levando à progressão da doença apesar do tratamento com drogas modificadoras da doença (WAXMAN, 2005). Disfunção cerebelar na EM parece aumentar pela combinação de lesões nas substâncias branca e cinzenta. Estudos de lesão na substância cinzenta na EM têm recebido menos atenção do que estudos de lesão na substância branca. No entanto, estudos de lesão da substância cinzenta evidenciam extensa desmielinização, inflamação e perda neuronal (LUCCHINETTI et al., 2011). Além disso, a atrofia cortical demonstrada na RMN é reconhecida como marcador para estabelecer a progressão da EM (STEENWIJIK et al., 2016).

1.1 Fisiopatologia da Esclerose Múltipla

Evidências indicam que a EM é iniciada pela ativação de linfócitos T (LT) e B (LB) na periferia contra componentes do SNC. A forma como estas células são ativadas ainda é pouco conhecida e estudos sugerem que estes linfócitos autorreativos reconhecem, na periferia, moléculas ou células com peptídeos semelhantes à mielina, podendo ser um gatilho para desencadear a doença. Estas células migram para o SNC onde reconhecem autoantígenos da mielina como proteína básica da mielina (*myelin basic protein-MBP*), proteína proteolipídica (*proteolipid protein-PLP*), glicoproteína oligodendrocítica da mielina (*myelin oligodendrocyte glycoprotein-MOG*) e a proteína de choque térmico sequestrada da mielina denominada alfa B cristalina (*alpha B crystallin*). Após o reconhecimento destas proteínas, as células do sistema imune são reativadas e desencadeiam uma cascata de reações inflamatórias que resultam na desmielinização e lesão de axônios. Enquanto a MOG e alfa B cristalina são expressas em lesões recentes, podendo ser marcadores de desmielinizações mais recentes, as proteínas MBP e PLP são expressas em lesões mais avançadas e indicam a degradação mais avançada da mielina. (WINQUIST et al., 2007; FARJAM et al., 2015).

Células apresentadoras de antígenos (APCs) da resposta imune inata, como as células dendríticas, entram em contato com o antígeno, se tornam ativadas, produzem citocinas e apresentam antígenos aos LT CD4⁺ *naïve* ou virgens. As APCs secretam diferentes citocinas e, dependendo da citocina produzida, os LT CD4⁺ *naïve* podem seguir vias diferentes de diferenciação. Na presença de interleucina (IL)-12, os LT CD4⁺ *naïve* se diferenciam em LT CD4⁺ T *helper* (Th)-1 e secretam interferon (IFN)- γ . Na presença de IL-23, os LT CD4⁺ *naïve* se diferenciam em LT CD4⁺ Th17 e secretam IL-17. As células Th17 e sua citocina IL-17 e a célula Th1 e sua citocina IFN- γ parecem exercer um importante papel na inflamação, enquanto as células T regulatórias (Treg) estão inibidas (GRIGORIADIS e VAN PESCH, 2015).

A resposta por LB tem sido amplamente reconhecida na EM, tanto na fase inicial quanto na fase progressiva da doença. Os LB têm sido encontrados nos subcompartimentos do SNC de pacientes com EM, incluindo líquido cefalorraquidiano (LCR), barreira hematoencefálica (BHE), parênquima e meninges. O padrão de lesão e desmielinização por LB ocorrem pela produção de anticorpos antimielina, formação de imunocomplexos e deposição de complemento. Também foram encontrados anticorpos antimielina dentro de células fagocíticas. Além disso, LB são excelentes APCs aos LT, antígenos estes reconhecidos pelos seus receptores de células B (BCR). E desta forma, na EM, os LB conseguem apresentar eficientemente neuroantígenos aos LT no SNC. Além disso, os LB podem modular a resposta imunológica dos LT e das células mielóides pela secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , linfotoxina alfa ou TNF- β ou anti-inflamatórias/regulatórias como IL-10 e IL-35. No entanto, estudos mostram que na EM, os LB estão anormalmente polarizados para respostas inflamatórias e que existem defeitos na sua função reguladora anti-inflamatória (MICHEL et al., 2015; LI et al., 2015).

Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α foram encontrados no LCR de pacientes com EM (AL-OMAISHI, BASHIR e GENDELMAN, 1999; ARGAW et al., 2006). Níveis aumentados de TNF- α têm sido associados com aumento da incapacidade avaliada pelo EDSS e indicados como preditores da atividade da doença (KURTZKE, 1983; OLIVEIRA et al., 2012; LJUBISAVLJEVIC et al., 2014). Citocinas do padrão de resposta Th1 como IL-2, IL-12 e IFN- γ geralmente estão aumentadas na doença ativa, enquanto as citocinas do padrão Th2 como IL-4 e IL-10 têm se apresentado aumentadas em doença em remissão (GAJEWSKI et al., 1989; HAUSER et al., 1990; FREI et al., 1991; AL-OMAISHI et al., 1999; MURPHY e REINER, 2002; KOGUCHI et al., 2006; IMAM et al., 2007; LJUBISAVLJEVIC et al., 2014). No entanto, o aumento concomitante de citocinas Th1 e Th2 pode estar presente durante os períodos de surto da doença (RODRIGUEZ-SAINZ et al., 2002; MORRIS e MAES, 2013).

1.2 Citocinas na Esclerose Múltipla

As principais citocinas envolvidas na fisiopatologia da EM são revisadas, a seguir.

1.2.1 TNF- α

O TNF- α é a principal citocina proinflamatória secretada, principalmente, por macrófagos e linfócitos Th1. Esta citocina possui efeito direto na indução de apoptose de oligodendrócitos e desmielinização (ARNETT et al., 2001). Em humanos, a expressão de TNF- α aumenta as lesões na EM e também é expresso por macrófagos, micróglia e astrócitos em lesões crônicas ativas (CANNELLA e RAINE, 1995). Estudos demonstraram uma correlação positiva entre os níveis de TNF- α e o curso clínico de EM (ZIPP et al., 1995; ANDREWS et al., 1998; VAN OOSTEN et al., 1998). Níveis séricos de TNF- α > 50 pg/mL e valores mensuráveis no LCR foram associados à atividade da doença visualizada pela presença de lesões gadolínio-positivas na RMN (SPULER et al., 1996). O aumento da expressão do TNF- α tem sido associado com a atividade clínica da EMRR e com o desenvolvimento da EMPP e EMSP. O TNF- α aumenta a resposta imune por meio da apresentação de antígenos pelas moléculas MHC de classe II, pelo aumento da expressão de moléculas de adesão e pela disfunção da BHE (IMITOLA et al., 2005).

O TNF- α é um mediador crítico envolvido na imunopatogênese da EM e possui uma ampla variedade de efeitos biológicos que, além da morte das células por apoptose, lesão isquêmica e citotóxica nos neurônios, está envolvido em mecanismos de neuroproteção. A coexistência de efeitos neurotóxicos e neuroprotetores desta citocina está relacionada à ligação a seus receptores TNFRI (ou p55) e TNFRII (ou p75) expressos na superfície das células ou na forma solúvel (sTNFRI e sTNFRII, respectivamente). O TNFRI está relacionado com um curso mais grave da doença, inflamação e desmielinização, enquanto que o TNFRII está relacionado com um curso mais brando da doença e remielinização (BERGOLKA e MILLER, 1998; SUVANNAVEJH et al., 2000; EHLING et al., 2003; IMITOLA et al., 2005). Concentrações da forma solúvel dos receptores têm sido encontradas e correlacionadas com a atividade clínica da EM e variações genéticas do *TNFR2* têm sido associadas com susceptibilidade e progressão clínica da EM (EHLING et al., 2003).

1.2.2 IL-12

Os níveis de IL-12 apresentaram-se elevados em pacientes com EM (WINDHAGEN et al., 1995). O aumento da expressão da IL-12 no SNC resulta em aumento da inflamação e infiltrado celular (CAMPBELL et al., 1998). Os níveis de RNAm da IL-12p40 estavam aumentados em células mononucleares periféricas estimuladas de pacientes com as formas EMRR e EMSP e foram correlacionados com o desenvolvimento de lesões ativas observadas no cérebro por RMN (VAN BOXEL-DEZAIRE et al., 1999).

1.2.3 IL-17

As células Th17 apresentam um papel crítico no desenvolvimento da resposta autoimune (YWAKURA, ISHIGAME, 2006). A diferenciação das células Th17 é orquestrada por várias citocinas incluindo IL-6, IL-1- β , TGF- β , IL-21 e IL-23 (estimulando) e IFN- γ , IL-4, IL-12, IL-10 e IL-27 (inibindo). A expressão de IL-17 gera um microambiente altamente inflamatório e induz a graves condições patológicas (COOKE, 2006). Estudos com análises de microarranjos de DNA com tecidos de pacientes com EM indicaram que a expressão do RNAm da IL-17 estava elevada nas lesões cerebrais ativas; além disto, a IL-17 estava presente nas lesões (LOCK et al., 2002).

IL-17 estimula a produção de IL-6 pelos astrócitos e produção de IL-6, TNF- α e IL-1 β pelos macrófagos, todas citocinas implicadas na fisiopatologia da EM (VAN WAGONER; BENVENISTE, 1999). Brucklacher-Waldert et al. (2009) mostraram que a proporção de células Th17 em pacientes com EM nas fases de surtos era significativamente mais elevada comparada com pacientes em fase de remissão da doença, tanto nas formas CIS como EMRR. Além disto, Sweeney colaboradores (2011) demonstraram que a terapia com IFN- β apresenta efeitos protetores na EM inibindo as células Th17, diretamente, via aumento da IL-27 que inibe as células Th17 ou indiretamente pela inibição das citocinas IL-23 e IL-1 que atuam no desenvolvimento das células Th17.

1.2.4 IFN- γ

Linfócitos produtores de IFN- γ foram encontrados em infiltrados perivasculares de pacientes com EM (DIHIB-JALBUT et al., 2006). IFN- γ e IL-12 estão aumentadas no cérebro, LCR ou sangue periférico de pacientes com EM, especialmente nas fases agudas de exacerbação da doença (HUANG et al., 2004). Pacientes com os surtos tinham aumento significativo de produção de IFN- γ pelas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) após serem estimuladas com fitohemaglutinina comparados com pacientes em remissão; entretanto, esta produção foi reduzida após tratamento com IFN- β (BECHER et al., 1999). Estudos clínicos usando IFN- γ para tratamento de pacientes com EM resultaram em aumento do número de exacerbações. Posteriormente, verificou-se que IFN- γ induz apoptose em oligodendrócitos humanos e, em lesões da EM, a expressão de IFN- γ está próxima aos oligodendrócitos apoptóticos, indicando que o IFN- γ contribui para o processo lesivo observado nas lesões da EM (POULY et al., 2000). Esta citocina é um dos alvos terapêuticos da terapia da EM. Cucci e colaboradores (2010) compararam os níveis de transcritos do RNAm de genes associados à resposta imune em pacientes que recebiam diferentes doses de IFN- β e confirmaram que o IFN- β diminui a expressão das moléculas próinflamatórias Th1 como IFN- γ e TNF- α , e aumenta as moléculas relacionadas à resposta Th2, como IL-10.

1.2.5 IL-4 e IL-10

IL-4 é uma citocina chave produzida pelas células Th2 e inibe as células Th1 pela diminuição das citocinas IL-1 e TNF- α . Níveis elevados de IL-4 podem reduzir a gravidade da encefalomielite autoimune experimental (EAE), enquanto que a sua ausência não altera o curso da doença, possivelmente porque outra citocina Th2 pode substituir suas funções e contribuir para a tolerância da EAE. Além disso, a administração de IL-4 na EAE melhora o quadro da doença e exerce um efeito protetor (CANELLA, RAINE, 1995).

Tanto na EMRR como na EMSP, ocorre aumento do número de PBMCs secretoras de IL-4 (KUCHROO et al., 1995). Mikulkova et al. (2011) encontraram níveis elevados de IL-4 em pacientes com EMRR comparados aos controles saudáveis. Os níveis séricos de IL-4 mostraram-se significativamente mais elevados entre os pacientes com EMRR com incapacidade leve do que entre os moderada ou grave. Este resultado confirma a importância desta citocina como modulador anti-inflamatório nos processos lesivos da EM (IMITOLA et al., 2005; TRENOVA et al., 2011).

IL-10 é uma citocina anti-inflamatória que modula a expressão da doença em pacientes com EM. Estudos relatam que a produção diferencial da IL-10 pode ser um fator na gravidade da EM (SAMOILOVA et al., 1998; LUOMALA et al., 2003). Ao contrário da IL-4, a ausência da IL-10 resulta em uma EAE mais grave, sugerindo que sua função não pode ser substituída por outra citocina Th2 (SAMOILOVA et al., 1998). Estudos mostram que PBMCs apresentam diminuição da IL-10 antes do início de uma exacerbação da EM em pacientes com EMRR (RIECKMANN et al., 1994). Os níveis de IL-10 foram significativamente reduzidos em pacientes com EMSP comparados com EMRR quatro semanas antes de visualização da atividade cerebral da doença por RMN e seis semanas antes de um surto clínico (VAN BOXEL-DENZAIRE et al., 1999).

O perfil de citocinas foi avaliado em 169 pacientes com EMRR na fase de remissão da doença e em 132 controles saudáveis da população do sul do Brasil (KALLAUR et al., 2013). Os resultados mostraram que os níveis de IFN- γ , IL-6, IL-12 e IL-4 estavam mais elevados nos pacientes com EMRR comparado a controles enquanto que a IL-1 foi mais elevada nos controles do que nos pacientes com EMRR; a IL-4 foi mais elevada nos pacientes com incapacidade leve do que os com incapacidade moderada ou grave; os níveis de TNF- α e IL-10 foram maiores nos pacientes com doença inativa comparados aos com doença ativa e baixos níveis de TNF- α e altos níveis de IFN- γ foram independentemente associados com a EMRR e atividade da doença. Os resultados indicaram que os pacientes com EMRR, mesmo na fase de remissão clínica, exibem uma complexa rede de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias que podem interagir para a modulação da progressão e atividade da doença. Posteriormente, um estudo realizado em 126 pacientes com EMRR, 32 com as formas progressivas (EMPP e EMSP) e 40 controles provenientes desta mesma população brasileira (KALLAUR et al., 2017) mostrou que as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-17, IL-4 e IL-10 foram mais elevadas nas formas progressivas do que nos controles e aumento de IL-1 β e IFN- γ e

diminuição de IL-12 e IL-4 foram observados em pacientes com as formas progressivas comparados aos com a EMRR. Os pacientes com as formas progressivas com progressão da doença apresentaram níveis mais elevados de TNF- α , IFN- γ e IL-10 do que os sem progressão e níveis mais elevados de TNF- α , IFN- γ e IL-17 e menores de IL-12 comparados com os com EMRR com progressão. Os autores verificaram, também, uma correlação inversa entre IL-10 e a incapacidade neurológica nos pacientes com as formas progressivas. Os resultados mostram o importante envolvimento do TNF- α , IFN- γ e IL-17 na fisiopatologia da progressão da doença e da IL-10 na modulação dos mecanismos envolvidos na incapacidade neurológica dos pacientes com as formas progressivas.

1.3 Polimorfismo genético *NcoI* do fator de necrose tumoral beta

Apesar das fortes evidências de que a patogênese da EM envolve uma interação entre fatores genéticos e ambientais, o progresso na identificação dos fatores de risco relevantes tem sido lento e praticamente não há entendimento sobre como podem interagir e resultar em doença. Variações nos genes que codificam a expressão e regulação de citocinas e seus receptores podem desempenhar um importante papel na susceptibilidade à EM e na progressão da doença (revisados por KALLAUR et al., 2011). Estudos genéticos de associação (*genome-wide association studies*, GWAS) mostram que 30,0% dos polimorfismos de um único nucleotídeo (*single nucleotide polymorphism*, SNP) associados à EM estão em genes que codificam citocinas, sinais de coestimulação e tradução de moléculas (GRIGORIADIS e VAN PESCH, 2015). Polimorfismos nos genes *TNF- α* e *TNF- β* estão relacionados com o aumento da susceptibilidade a doenças autoimunes (FUGGER et al., 1990; ROTH et al., 1994) e na fisiopatologia da EM (HUIZINGA et al., 1997; MYCKO et al., 1998; KAMALI-SAVERSTANI et al.; 2007).

Os genes *TNF- α* e *TNF- β* (linfotóxina alfa – LTA) estão inseridos na região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe III, no braço curto do cromossomo 6 humano (IMITOLA et al., 2005). Messer e colaboradores (1991) descreveram um SNP localizado na posição +252 do primeiro íntron do gene *TNF- β* que consiste na troca de uma guanina (G) no alelo mais frequente por uma adenina (A) no alelo menos frequente, detectado por meio do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) após a digestão com a enzima de restrição *NcoI*, sendo denominado de polimorfismo *NcoI* do gene *TNF- β* . O alelo G apresenta o sítio de restrição para a enzima *NcoI* e com a troca G>A, ocorre perda deste sítio de restrição; assim três genótipos TNFB1/B1 (GG), TNFB1/B2 (GA) e TNFB2/B2 (AA) podem ser determinados por amplificação do gene pela reação em cadeia da polimerase, digestão do produto amplificado pela enzima *NcoI* e determinação do polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) (Messer et al., 1991). Inicialmente, foi denominado como polimorfismo +252 (G>A) e, atualmente, é identificado como rs909253 pelo Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for*

Biotechnology Information – NCBI). O NCBI é o local de armazenamento de genoma (*geneBank*) e descreve que o SNP rs909253 ocorre na posição +501 e considera o alelo A como alelo ancestral e mais frequente e o alelo G como alelo variante e menos frequente.

Estudos têm demonstrado que o polimorfismo rs909253 é potencialmente funcional e que está relacionado com aumento das condições inflamatórias por resultar em alterações na região transcricional do gene *TNF- α* , com aumento na expressão deste gene e, conseqüentemente, em maior produção da citocina *TNF- α* , um importante fator na patogênese da EM (MESSER et al., 1991; EBERS e SANDOVNICK et al., 1994; SHARMA et al., 2006).

Diferenças individuais na capacidade de produção do *TNF- α* podem ser causadas por diferenças na taxa de transcrição, de regulação da estabilidade do RNAm, na eficiente tradução ou processamento da proteína madura. Polimorfismos nos genes que codificam as proteínas que regulam esse processo podem causar diferenças na produção do *TNF- α* (HUIZINGA et al., 1997).

Kamali-Savertani e colaboradores (2007) avaliaram o polimorfismo *NcoI* no gene *TNF- β* e o polimorfismo -308 no promotor do *TNF- α* na população iraniana com EM. A frequência alélica e genotípica encontrada em ambos os polimorfismos não diferiu entre os pacientes com EM e controles, sugerindo que estes polimorfismos não estariam relacionados com a susceptibilidade à EM. No entanto, um estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que o polimorfismo genético rs909253 está associado a EM e pode ter um papel na susceptibilidade a EM na população brasileira independentemente da presença do alelo HLA-DRB1*15 (KALLAUR et al., 2014a) e que o genótipo AA (TNFB2/B2) está associado com aumento dos níveis séricos de *TNF- α* (KALLAUR, 2013). Posteriormente, este polimorfismo foi associado aos marcadores inflamatórios e metabólicos nesta mesma coorte de pacientes com EM (KALLAUR et al., 2014b). Neste estudo, pacientes do sexo feminino com o genótipo AA (TNFB2/B2) apresentaram diminuição dos níveis plasmáticos de IL-4 e IL-10 e aumento de *TNF- α* , glicose, insulina e resistência à insulina do que as pacientes com outros genótipos; no entanto, entre os homens com EMRR, os que apresentavam o genótipo AA (TNFB2/B2) exibiram aumento dos níveis de *TNF- α* , IFN- γ e IL-17 e diminuição dos níveis de IL-4, IL-10, insulina e resistência à insulina comparados aos pacientes com outros genótipos. Estes resultados sugerem que o genótipo AA (TNFB2/B2) do polimorfismo rs909253 está associado ao aumento de marcadores inflamatórios e metabólicos e esta associação é diferente de acordo com o sexo dos pacientes com EMRR.

1.4 Estresse oxidativo e nitrosativo

Além dos mecanismos imunológicos, existem evidências que o estresse oxidativo e nitrosativo exercem um papel crucial na fisiopatologia da EM. Estudos investigaram o possível papel das EROs como superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) e das ERNs como peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$) na etiologia e patogênese da EM (VAN HORSSSEN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012). A interação entre EROs e óxido nítrico (NO) leva à formação do peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), uma molécula extremamente reativa responsável pela oxidação de proteínas, lipídeos e DNA. EROs e ERNs geradas em excesso pela micróglia ativada têm sido implicadas como mediadores da degeneração da mielina e dos oligodendrócitos e parecem atuar como fator agravante para a doença, contribuindo para a formação e persistência das lesões características da EM (GILGUN-SHERKI; MELAMED; OFFEN, 2004; VAN HORSSSEN et al., 2008), sendo considerados fortes marcadores da doença (AMORINI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016).

O estresse oxidativo exerce um profundo efeito na patogênese de doenças neurodegenerativas pela alta susceptibilidade do cérebro aos danos induzidos pelas EROs e ERNs, por várias razões, tais como: 1) elevado consumo de oxigênio; 2) elevada produção de EROs e ERNs, que se originam de reações neuroquímicas específicas como a oxidação de dopamina e glutamato; 3) elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados e outros lipídeos como a mielina, que são particularmente mais vulneráveis à peroxidação lipídica; 4) aumento do depósito de íons metálicos no cérebro com a idade, como o ferro que atua como pró-oxidante em condições patológicas catalisando a produção de maiores níveis de EROs e ERNs (CHIURCHIÙ e MACCARRONE, 2011; FRIEDMAN, 2011). Por outro lado, pesquisas diretas em tecido cerebral de pacientes afetados por doenças neurodegenerativas revelam uma redução de defesa celular antioxidante, especialmente devido à redução dos antioxidantes relevantes como superóxido dismutase, catalase, glutathione/glutathione peroxidase, α -tocoferol e ácido úrico (LANGEMANN, KABIERSCH, NEWCOMBE, 1992). De fato, baixos níveis de antioxidantes podem aumentar a atividade da lipoxigenase, aumentando o processo imunoinflamatório no cérebro. Além disto, o excesso de EROs pode estimular a atividade de células T pela cascata do ácido araquidônico ou produzir direta ou indiretamente danos a BHE ou aos neurônios (LEHNER et al., 2011).

Outro componente resultante do estresse oxidativo é a liberação do ferro divalente (Fe^{2+}) de células destruídas no meio extracelular, o que estimula a formação de radical hidroxila, também responsáveis pela oxidação de proteínas, lipídeos e DNA. O ferro se acumula no cérebro humano com o passar do tempo e é armazenado, principalmente, nos oligodendrócitos e mielina. E desta forma, a amplificação da lesão cerebral pelo ferro associado ao estresse oxidativo é importante em doenças desmielinizantes devido a destruição dos oligodendrócitos e ativação crônica da micróglia (CROSS et al., 1998; HAMETNER et al., 2013; LASSMANN e VAN HORSSSEN, 2016).

Os maiores produtores de EROs e ERNs são as células do sistema imunológico, especialmente as células fagocíticas, como micróglia e leucócitos infiltrados no SNC, devido a elevada expressão de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e xantina oxidase. As enzimas iNOS e NADPH oxidase são responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido, respectivamente. Estas duas moléculas pró-oxidantes levam à formação de peroxinitritos, um potente oxidante envolvido na lesão dos oligodendrócitos e axônios na EM (CHIURCHIU, ORLACCHIO e MACCARRONE, 2016).

As moléculas do estresse oxidativo apresentam um rápido período de ação. Em condições patológicas, proteínas oxidadas e nitrosiladas só conseguem serem detectadas em uma pequena janela de tempo durante a lesão ativa da EM e próximo às células inflamatórias (LASSMANN e VAN HORSEN, 2016). Estudos mostram que níveis aumentados de peroxinitrito foram encontrados na EM ativa (GONSETTE, 2008). EROs podem desregular a BHE, o que resulta em rápida progressão da doença devido a entrada de monócitos contribuindo para a inflamação (ORTIZ et al., 2013). Fiorini et al. (2013) mostraram que pacientes com EMRR apresentaram níveis mais elevados de proteínas oxidadas do que os controles.

A forma EMRR e as formas progressivas da EM são causadas por diferentes mecanismos lesivos. A inflamação aguda local está associada com início dos surtos na EMRR, enquanto que a inflamação disseminada está associada com a degeneração axonal e progressão da doença. O estresse oxidativo parece contribuir com ambos processos (BJARTMAR e TRAPP, 2001; GILGUM-SHERKI, MELAMED e OFFEN, 2004). Níveis aumentados dos marcadores do estresse oxidativo foram obtidos durante os surtos e níveis indivíduos durante a fase de remissão clínica da EM. A presença de marcadores do estresse oxidativo no LCR e plasma tem sido positivamente associada ao EDSS (GAJEWSKI et al., 1989; LJUBISAVLJEVIC et al., 2014).

Nosso grupo de pesquisa verificou aumento do estresse oxidativo em pacientes com EM, mesmo em fase de remissão clínica da doença, sendo o primeiro estudo a demonstrar que o estresse oxidativo está associado à progressão da EM avaliada pelo EDSS nestes pacientes (OLIVEIRA et al., 2012).

Níveis aumentados de iNOS, NO e seus metabólitos nitrito e nitrato (NOx) têm sido detectado nas lesões no cérebro e no LCR assim como níveis aumentados de NOx no LCR, mas não no plasma, têm sido associados com a progressão da doença (ENCINAS, MANGANAS e ENIKOLOPOV, 2005). Níveis aumentados de estresse oxidativo também têm sido correlacionados com a impregnação de gadolínio nas lesões do SNC demonstradas pela RMN, um marcador de neuroinflamação aguda e permeabilidade da BHE (LJUBISAVLJEVIC et al., 2014).

Oliveira et al. (2017) demonstraram a presença de níveis significativamente elevados de ferritina e peroxidação lipídica e níveis indivíduos de albumina, capacidade antioxidante total do plasma, produtos avançados de oxidação protéica (AOPP) e NOx nos pacientes com EM quando

comparados aos controles. Na regressão logística ajustada para idade, os autores também demonstraram que a ferritina e peroxidação lipídica estavam positivamente associadas a EM, atuando como preditores para o desenvolvimento da doença. Já os níveis de albumina, capacidade antioxidante total do plasma, AOPP e NOx foram negativamente associados com EM. Em outra regressão logística ajustada para idade, pacientes com formas progressivas da EM apresentaram níveis individuais de albumina e aumentados de AOPP quando comparados aos pacientes com a forma EMRR.

O dano pelo estresse oxidativo é amplificado na presença de cátions como Fe^{2+} e cobre (Cu^{2+}). Na presença destes íons, H_2O_2 é convertido em hidroxilas altamente reativas pela reação de Fenton. No estado fisiológico, o ferro se acumula no cérebro com o passar do tempo e é armazenado na mielina, oligodendrócitos e micróglia na forma do ferro trivalente (Fe^{+3}) ligado à ferritina. Na EM, devido às lesões, o ferro é liberado no espaço extracelular onde é transformado em ferro Fe^{2+} aumentando a toxicidade das EROs. O ferro livre é recolhido pela micróglia e macrófagos e estas células se acumulam nas bordas das lesões e podem ir para o espaço perivascular (BAGNATO et al., 2011; MEHTA et al., 2013; MAHAD, TRAPP e LASSMAN, 2015). Nas formas progressivas, o acúmulo de peroxidação lipídica está parcialmente relacionado ao acúmulo de ferro nas lesões. Áreas mais comuns de depósito de ferro são as do gânglio basal, tálamo e hipotálamo, com apresentação de maior neurodegeneração e atrofia mesmo nos estágios iniciais da EM (HAMETNER et al., 2013; LANSLEY et al., 2013; MAHAD, TRAPP e LASSMAN, 2015).

As EROs e ERNs são fisiologicamente neutralizadas por várias moléculas antioxidantes que podem ser de origem enzimática como a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, ou não enzimática como ácido úrico (AU), glutathione, vitamina C, vitamina E, entre outras (AMORINI et al., 2009). Estudos demonstraram redução da capacidade antioxidante total do plasma avaliada pelo método do Parâmetro Antioxidante Relacionado à captura total de radicais (TRAP) em pacientes com EM (BESLER; COMOGLU, 2003); também foi demonstrada reduzida atividade dos antioxidantes não enzimáticos AU, glutathione e vitamina E (VAN MEETEREN et al., 2005; RENTZOS et al., 2006).

A Figura 2 sumariza os mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos no processo fisiopatológicos de desmielinização na EM.

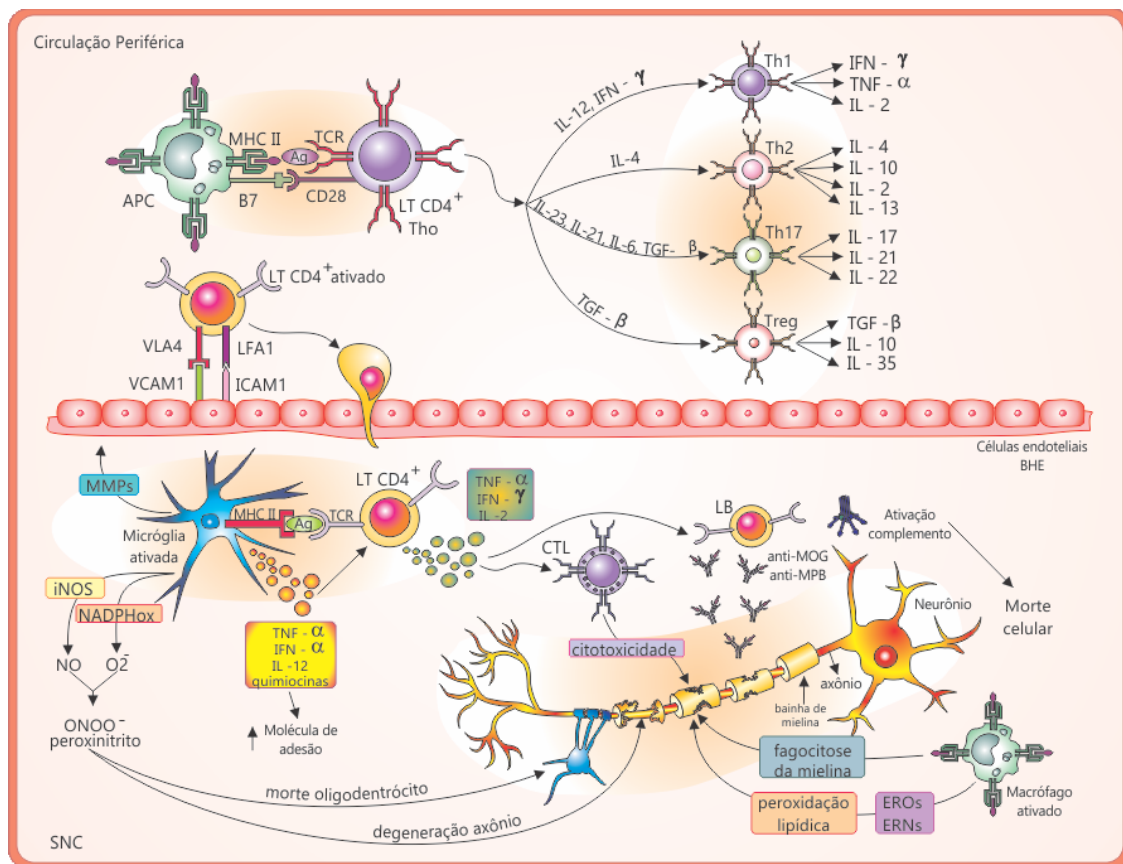


Figura 2 Mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos no sistema nervoso central (SNC) em pacientes com esclerose múltipla (EM). Macrófagos da circulação periférica apresentam antígenos com epítomos semelhantes à mielina aos linfócitos T CD4⁺ *naïves* (Th0) que, após ativadas, podem se diferenciar em Th1, Th2, Th17 e T reguladora (Treg). Os Th1 ativados ligam-se às células endoteliais por meio das moléculas de adesão (VLA4 se liga à VCAM-1 e LFA1 se liga à ICAM-1), facilitando a entrada destas células no SNC através da barreira hematoencefálica (BHE). No parênquima nervoso, um novo contato ocorre entre as células T CD4⁺ e macrófagos ou microglia. Nesta fase de reativação, a microglia torna-se ativada e produz grande quantidade de mediadores pró-inflamatórios como fator de necrose tumoral α (TNF- α), interferon α (IFN- α), IL-12, quimiocinas, metaloproteínas de matriz (MMPs) e aumento da expressão de moléculas de adesão. Ocorre aumento da expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO) e ânion superóxido, respectivamente. Estas duas moléculas levam à formação de peroxinitrito que é um potente oxidante envolvido na lesão dos oligodendrócitos e axônios na EM. LT CD4⁺ ativados produzem IL-2 e IFN- γ que estimulam linfócitos B na produção de anticorpos anti-MOG e anti-MBP, que fixam o complemento levando à morte celular. Estas citocinas também estimulam linfócitos T citotóxicos (CTL) que agem diretamente nas lesões desmielinizantes. Os macrófagos perivascularmente ativados também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) que reagem com lipídeos poli-insaturados causando peroxidação lipídica e fagocitose da mielina. Todos estes mecanismos contribuem para o processo de desmielinização na EM. Fonte: Adaptado de: OLIVEIRA et al. (2014).

1.5 Depressão na esclerose múltipla

A EM é a doença desmielinizante que mais apresenta incapacidade neurológica. Além disto, também afeta aspectos emocionais, psíquicos, cognitivos e sociais na vida do paciente (RANDOLPH e ARMETT, 2005; ZIEMSEN, 2009; ASKARI et al., 2014). A depressão é a manifestação psiquiátrica mais comum na EM e acomete mais de 50,0% dos pacientes (SKOKOUM, SOUBASI e GOURZIS, 2012; FEINSTEIN et al., 2014) e, nestes pacientes, sua causa não está completamente elucidada (RANDOLPH e ARMETT, 2005; ZIEMSEN, 2009; ASKARI et al., 2014). A depressão pode ser avaliada pela Escala de Depressão e Ansiedade (*Hospital Anxiety and Depression Scale* -HADS) que foi validada para avaliação do grau de depressão em pacientes não psiquiátricos (ZIGMOND e SNAITH, 1983; NORTON et al., 2013). Possa et al. (2017) mostraram que a depressão estava associada à incapacidade em, aproximadamente, 40,0% dos pacientes.

A atrofia cerebral ou desmielinização no lobo frontal e hipocampo tem sido relacionada a sintomas depressivos nos pacientes com EM (FEINSTEIN et al., 2014; STUKE et al., 2016). Outro estudo mostrou um volume reduzido da substância cinzenta em pacientes com EM e depressão quando comparados aos com EM sem depressão, especialmente na região frontal e córtex, hipocampo, núcleo caudado e globo pálido (BIELAU et al., 2005; KIM, HAMILTON, GOTLIB, 2007; COLE et al., 2011).

Na EM, a depressão precede o início dos sintomas neurológicos e está associada com diminuição da qualidade de vida e aumento da morbidade e mortalidade (MAES et al., 2011a; VATTAKATUCHERY, RICKARDS e CAVANNA, 2011; FEINSTEIN et al., 2014). O tratamento com IFN- β pode causar ou exacerbar a depressão e, por isso, é indicada a troca pelo acetato de glatiramer quando este sintoma aparece (FRAGOSO et al., 2010; ZIEMSEN et al., 2014).

Maes e colaboradores (2011b) demonstraram que pacientes com EM e depressão apresentaram níveis aumentados de monócitos e citocinas padrão Th1, além de apresentarem níveis elevados de marcadores de peroxidação lipídica e expressão da iNOs. Outro estudo mostrou que o aumento na produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1 estava significativamente correlacionado com aumento da gravidade da depressão nos pacientes com EM (POKRYSZKO-DRAGAN et al., 2012). Estudos também mostraram que o aumento de IFN- γ pelas células T autorreativas na EM, que está associado com depressão, é reduzido pelo tratamento com antidepressivos (POKRYSZKO-DRAGAN et al., 2012).

A figura 3 ilustra as principais células e moléculas que participam dos mecanismos lesivos envolvidos na fisiopatologia da esclerose múltipla com depressão.

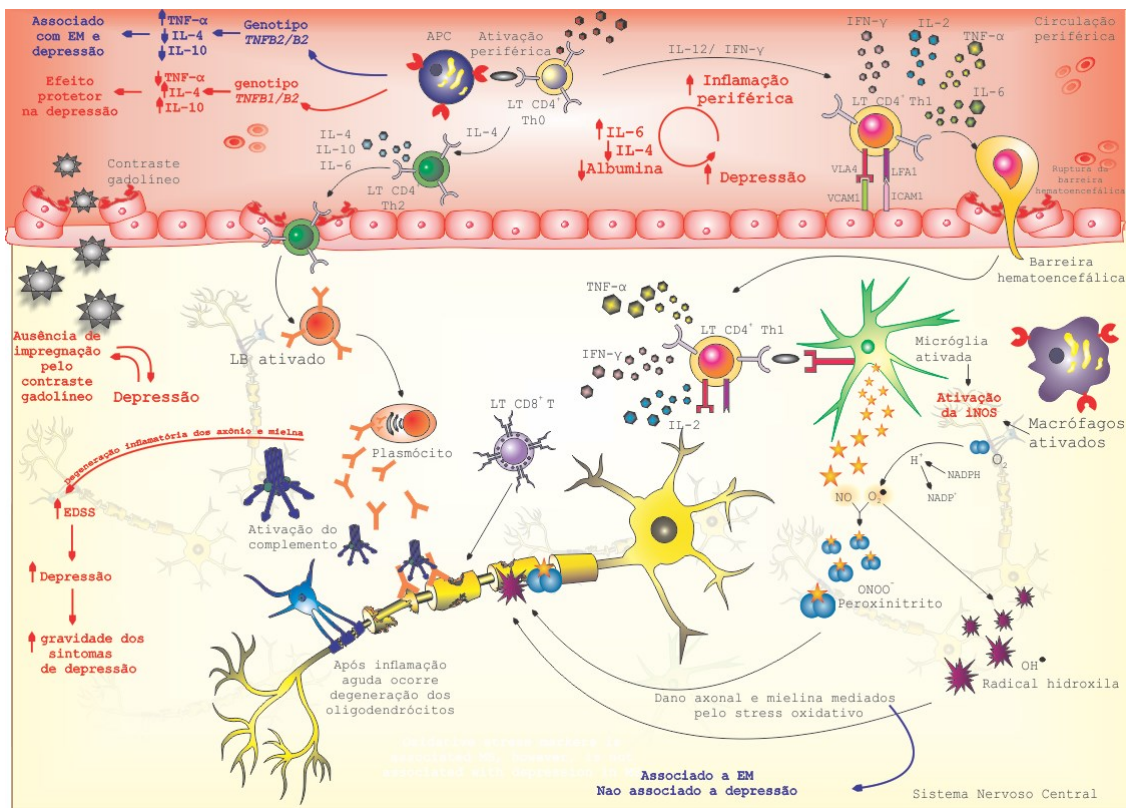


Figura 3 Mecanismos inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo envolvidos na depressão em pacientes com esclerose múltipla (EM). Células apresentadas de antígeno (APC) da circulação periférica apresentam antígenos com epítomos semelhantes à mielina aos linfócitos T CD4⁺ *naïves* (Th0) que, após ativadas, podem se diferenciar em Th1 e Th2 sobre a ação de interleucina (IL)-12/ interferon gama (IFN-γ) e IL-4, respectivamente. Células Th1 ativadas passam a produzir IFN-γ, IL-2, fator de necrose tumoral α (TNF-α) e IL-6, ligam-se às células endoteliais por meio das moléculas de adesão facilitando a entrada destas células no sistema nervoso central (SNC) através da barreira hematoencefálica (BHE). Células Th2 ativadas produzem IL-4, IL-10 e IL-6. Indivíduos com EM e depressão, produzem níveis aumentados de IL-6 e diminuídos de IL-4 e albumina. Indivíduos com EM e depressão que apresentam genótipo TNFB2/B2 apresentam elevados níveis de TNF-α e baixos níveis de IL-4 e IL-10. Indivíduos com EM com depressão que apresentam o genótipo GA (TNFB1/B2) apresentam baixos níveis de TNF-α e altos níveis de IL-4 e IL-10, apresentando um efeito protetor para depressão. A ruptura da BHE permite a entrada de contraste gadolínico em exames de ressonância magnética nuclear, marcador de lesão ativa e atividade da doença. Indivíduos com EM e depressão apresentaram ausência de impregnação pelo contraste gadolínico associado à maior incapacidade avaliada pelo EDSS e maior gravidade dos sintomas de depressão, provavelmente devido a inflamação crônica e lesão tecidual. Após a entrada nas células Th1 e Th2 no SNC, um novo contato ocorre entre as células Th1 e macrófagos ou micróglia, e LT Th2 e linfócitos B (LB), acarretando na ativação destas células. Nesta fase de reativação, a micróglia torna-se ativada e produz grande quantidade de mediadores proinflamatórios como TNF-α, IFN-α, IL-12 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. Por outro lado, os LT Th2 ativados

que estimulam linfócitos B na produção de anticorpos anti-MOG e anti-MBP, que fixam o complemento levando à morte celular. Linfócitos T citotóxicos (CTL) agem diretamente nas lesões desmielinizantes. Os macrófagos perivasculares ativados também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênios (ERNs) que reagem com lipídeos poli-insaturados causando peroxidação lipídica e fagocitose da mielina. Todos estes mecanismos inflamatórios e estresse oxidativo e nitrosativo contibuem para o processo de desmielinização na EM, no entanto o estresse oxidativo parece nao contribuir para o aparecimento e gravidade dos sintomas da depressão.

1.6. Tratamento da EM

Para o tratamento de pacientes com EM, há de se considerar as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2015), tendo como suporte as evidências da literatura internacional e conhecimentos obtidos na prática clínica. As três gerações de medicamentos modificadores da doença que têm sido desenvolvidas desde 1993 tratam o primeiro estágio da doença, onde a inflamação é predominante. Para pacientes que apresentam doença progressiva com pouca (ou nenhuma) atividade inflamatória e predominante degeneração, não há medicamentos com eficácia comprovada. Portanto, o objetivo do tratamento da EM seria prolongar, o máximo possível, o tempo para o paciente atingir o segundo estágio da doença (COMINI-FROTA et al., 2017). A terapia da EM envolve: a) tratamento dos surtos, com corticoides em doses altas (metilprednisolona) e plasmaferese; b) medicamentos modificadores do curso da doença ou imunomoduladores como IFN- β 1a, IFN- β 1b, acetato de glatiramer e imunoglobulina G humana intravenosa; c) medicamentos imunossupressores como azatioprina, ciclofosfamida, mitoxantrona, metotrexato, micofenolato mofetil, fingolimode, laquinimode, dimetil fumarato, teriflunomida e os anticorpos monoclonais natalizumabe, rituximabe e alemtuxumabe (COMINI-FROTA et al., 2017).

Estudos mostraram que pacientes com EM tratados com IFN- β 1b apresentaram menor expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α e maior expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (CUCCI et al., 2010). O IFN- β apresenta efeitos protetores na EM via inibição das células Th17, diretamente, pelo aumento da expressão da IL-27, que inibe as células Th17, ou indiretamente pela inibição das citocinas IL-23 e IL-1 que atuam no desenvolvimento das células Th17 (SWEENEY et al., 2011).

O acetato de glatiramer é um polímero composto por quatro aminoácidos que são encontrados na mielina. O medicamento funciona como uma falsa mielina e faz com as células de defesa ataquem o polímero ao invés da mielina. A administração de acetato de glatiramer leva a uma alteração do perfil pró-inflamatório Th1 para perfil anti-inflamatório Th2 (CARPINTERO e BURGER, 2011).

O natalizumabe é um anticorpo monoclonal dirigido contra a subunidade $\alpha 4$ do receptor *very late antigen 4* (VLA 4), $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, localizado na superfície de linfócitos. A imunoglobulina IgG₄ humanizada se liga especificamente à superfície de células mononucleares circulantes que apresentam a subunidade $\alpha 4$ do VLA4 inibindo a ligação do VLA4 às moléculas de adesão molécula da adesão

celular vascular (VCAM) presente no endotélio; inibindo, deste modo, a passagem das células através do endotélio. Na EM, os efeitos observados estão relacionados ao bloqueio do tráfego de células T através do endotélio e BHE. Natalizumabe é utilizado para o tratamento de pacientes com EM-RR (YEDNOCK et al., 1992; RAMOS-CEJUDO et al., 2011).

Fingolimode (FTY720) é uma terapia oral para o tratamento da EM-RR. FTY720 é um análogo estrutural do fosfato de esfingosina-1 (S1P) e ligante do receptor de esfingodina 1 (S1PR), uma proteína G acoplada de esfingosina. Este receptor possui importante papel na saída dos LT e LB dos órgãos linfóides secundários e timo. FTY720 sequestra os linfócitos nos linfonodos e impede sua saída, não permitindo que alcance o SNC para as respostas autoimunes na EM. O efeito terapêutico também se deve à habilidade da droga internalizar os receptores S1PR, o que resulta em células não responsivas ao ligante natural S1P, impedindo sua saída dos linfonodos (BRINKMANN et al., 2002; WU et al., 2013).

Alentuzumabe é uma imunoglobulina monoclonal IgG1 que tem como alvo receptor CD52 presente em linfócitos e monócitos maduros, depletando, seletivamente, estas células enquanto células progenitoras permanecem inalteradas. Após depleção, ocorre a indução da formação de novas células T, com predomínio de LT reguladores (FARJAM et al., 2015). Alentuzumabe mostrou-se eficaz na prevenção das placas de desmielinização observadas na RMN e na diminuição dos surtos; no entanto, não teve efeito sobre o aumento da incapacidade (COLE et al., 2012).

O dimetil fumarato é um metabólito primário do monometil fumarato que ativa o fator de transcrição nuclear E2 (Nfr2), um importante ativador de genes citoprotetores em situações de estresse oxidativo (GOPAL et al., 2017).

Teriflunomida é um fármaco de administração oral, metabólito da leflunomida, que inibe uma enzima mitocondrial essencial na síntese das pirimidinas necessária para rápida expansão de linfócitos T ativados. Assim, ao inibir a síntese das pirimidinas, ocorre a inibição a proliferação de LT e LB ativados e, com isto, menor disponibilidade de células para atravessar a BHE, e não altera a proliferação homeostática de linfócitos (MILLER, 2016).

Infelizmente, independente da estratégia terapêutica seguida e das drogas escolhidas, cerca de 10,0% dos pacientes apresentarão progressão na sua doença, com acúmulo de neurodegeneração e sequelas irreversíveis. Há, também, uma pequena porcentagem de pacientes, em torno de 10,0%, que responderão bem ao primeiro medicamento prescrito, com ótimo controle dos surtos e carga lesional na RMN, que parece ocorrer independente do medicamento (COMINI-FROTA et al., 2017). Entre estes dois extremos, existem muitos pacientes que vão se beneficiar com os medicamentos que sejam mais apropriados ao seu perfil de resposta inflamatória e de estresse oxidativo e nitrosativo, o que aponta a necessidade de se conhecer, cada vez melhor, as células e moléculas envolvidas na fisiopatologia da EM que possam ser biomarcadores da doença e novos alvos terapêuticos.

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, a grande maioria das terapias aprovadas para o tratamento da EM têm como alvo o componente inflamatório da doença; no entanto, está se tornando claro que, semelhante ao tratamento de pacientes com câncer, a estratégia terapêutica de sucesso na EM deve envolver a combinação de diferentes alvos terapêuticos que predominam nos diferentes processos fisiopatológicos da EM. No entanto, o desenvolvimento de terapias específicas a estes processos lesivos será muito difícil sem o uso de biomarcadores que refletem os processos alvo.

Compreender a fisiopatologia da EM também nos pode levar a identificar biomarcadores que possam prever algumas características da evolução da doença em um determinado paciente, como a forma clínica, a atividade da doença e o aparecimento de novas lesões no SNC, o aparecimento de surto, aumento da incapacidade, progressão da doença e presença de depressão. Estes biomarcadores poderiam ser utilizados para melhorar o monitoramento dos pacientes com EM e a conduta médica, como necessidade de mudanças nos protocolos de atendimento e tratamento destes pacientes.

Vários polimorfismos genéticos descritos nas diferentes populações mundiais têm sido associados com a susceptibilidade, resistência, curso clínico e gravidade da EM. Entretanto, resultados contraditórios são registrados na literatura, principalmente quando populações geneticamente mais homogêneas, como as do Hemisfério Norte, são comparadas. Poucos estudos avaliam a frequência de polimorfismos genéticos associados à EM nas populações do Hemisfério Sul, incluindo a população brasileira, geneticamente mais heterogênea que as previamente estudadas.

Diante de uma doença neurológica tão complexa e heterogênea como a EM, tornam-se necessários estudos para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade, incapacidade, progressão e presença de depressão na EM, na tentativa de identificar biomarcadores viáveis que contribuam para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento de pacientes com EM. Entender a fisiopatologia da EM se torna crucial para identificar vias imunológicas e não imunológicas envolvidas na doença e escolher alvos que possam ser modulados farmacologicamente, contribuindo para uma terapia mais eficaz nas suas diferentes formas clínicas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar polimorfismo genético *NcoI* do *TNF-β*, marcadores inflamatórios e do estresse oxidativo e nitrosativo como preditores da incapacidade neurológica, progressão da doença e depressão em pacientes com EM.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a associação entre os genótipos, marcadores inflamatórios, do estresse oxidativo e nitrosativo e a incapacidade neurológica, progressão da doença e presença de depressão em pacientes com EM;
- Determinar a relação entre as funções do EDSS (piramidal, cerebelar, sensitiva, tronco cerebral, vesical, intestinal, visual, mental, outros achados) e a incapacidade, progressão da doença e depressão em pacientes com EM;
- Avaliar a neuroinflamação e atividade da doença, determinada pela impregnação de gadolínio na RMN, em pacientes EM com depressão e sem depressão
- Avaliar a relação entre gravidade da depressão e marcadores do estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e incapacidade neurológica.

4. METODOLOGIA

4.1 Comitê de Ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (CAAE n. 0140.0.268.000-10, Parecer de Aprovação n. 159/2010) (ANEXO A). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (ANEXO B).

4.2 Delineamento

Inicialmente, foi realizado um estudo descritivo, observacional em dois grupos de indivíduos, pacientes com EM e controles sem a doença (estudo de caso-controle). Posteriormente, foi realizado um estudo longitudinal com seguimento ambulatorial durante 5 anos envolvendo os pacientes com EM.

4.3 População

A população de casos foi constituída por pacientes com EM adultos, ambos os sexos, atendidos no Ambulatório de Neurologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A população controle foi constituída por doadores de sangue fidelizados, de ambos os sexos, que procuraram o Hemocentro Regional de Londrina, em Londrina, Paraná, no mesmo período da realização do estudo.

4.4 Amostra

A amostra de pacientes com EM foi obtida por conveniência de tempo e local, de forma consecutiva, sendo incluídos 212 pacientes (150 mulheres e 62 homens). Os pacientes tiveram o diagnóstico de EM segundo os critérios de McDonald revisados (POLMAN et al., 2010), classificados

como EMRR, EMSP, EMPP e CIS. Destes, 150 apresentavam a forma clínica remittente recorrente (EMRR) e 61 as formas progressivas (EMSP + EMPP). Todos os pacientes estavam em remissão clínica da doença, ou seja, com ausência de surtos há, pelo menos, três meses da entrada no estudo. Pacientes com neuromielite óptica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esclerose amiotrófica lateral foram excluídos do estudo.

O grupo controle foi constituído por 249 indivíduos (177 mulheres e 72 homens) entre os doadores de sangue fidelizados do Hemocentro Regional de Londrina Também foram selecionados de forma consecutiva, por conveniência de espaço e tempo, no mesmo período de realização do estudo. Foram incluídos doadores de sangue que não apresentaram reatividade em todos os testes sorológicos empregados na triagem sorológica para doadores de sangue, segundo as normas do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004). Os indivíduos inseridos neste grupo não apresentavam características clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, renal, cardíaca ou hepática e reportaram não fazerem uso de medicamentos anti-inflamatórios e suplementos antioxidantes. Todos os indivíduos envolvidos neste estudo relataram não fazer uso de bebidas alcoólicas regularmente e não praticavam exercício físico regularmente.

4.5 Dados demográficos, epidemiológicos, antropométricos e clínicos

Os dados demográficos como idade, sexo e etnia, epidemiológicos, antropométricos como peso, altura, circunferência abdominal e índice de massa corpórea (IMC), clínicos (formas clínica, EDSS, RMN e tratamento) dos pacientes inseridos no estudo foram coletados pelo grupo de pesquisa por meio de um questionário padronizado (ANEXO C), em consulta aos prontuários médicos do Hospital Universitário (HU) da UEL e à base de dados do Hemocentro Regional de Londrina e LABHOS do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do HU/UEL.

A etnia foi classificada de acordo com a autopercepção do indivíduo em Caucasiano e não Caucasiano (SUAREZ-KURTZ et al., 2012; BRASIL, 2013). As medidas antropométricas avaliadas foram peso corporal (Kg), altura (m) e circunferência abdominal (cm), obtidas por interrogatório e mensuração direta pela equipe de pesquisadores, durante a aplicação do questionário. O IMC foi calculado como peso (Kg) dividido pela altura (m) ao quadrado e expresso em kg/m^2 .

A idade do início da doença foi obtida por consulta aos registros médicos. A incapacidade foi avaliada por meio da EDSS obtida durante as consultas ambulatoriais em 2006 (*baseline*) e após 5 anos de seguimento, em 2011, com escores que variam de 0,0 a 10,0 (KURTZKE, 1983). Para a determinação do escore de EDSS, cada função (piramidal, cerebelar, sensitiva, tronco cerebral, vesical, intestinal, visual, mental e outros achados) é pontuada de zero (0,0) a seis (6,0) com base nos sintomas clínicos do paciente, com posterior somatória dos resultados e definição do escore final (KURTZKE, 1983). Com os escores do EDSS, os pacientes foram categorizados com incapacidade

leve (EDSS <3) e moderada/grave (EDSS ≥3). Em todos os pacientes, o EDSS foi avaliado no período de remissão clínica (KOCH et al., 2007).

A progressão da EM foi avaliada por dois métodos: para pacientes com EDSS basal < 6,0 foi considerada progressão quando ocorreu aumento de um ponto no EDSS; e para pacientes com EDSS ≥ 6,0, foi considerada progressão quando ocorreu aumento de 0,5 ponto na EDSS (KOCH et al., 2007). Outro método utilizado foi com base na variação dos escores de EDSS apresentados em 2011- 2006 (Δ EDSS), sendo os valores residualizados computados por meio de análise de regressão com EDSS de 2011 como variável dependente e EDSS de 2006 como variável explanatória. Com estes dois métodos, os pacientes foram classificados em EM com progressão e sem progressão.

A realização da RMN revelou a localização da lesão (cérebro, medula espinhal, nervo óptico) e presença de lesões positivas pela impregnação do contraste gadolínio, indicando doença em atividade. Os dados foram obtidos pela análise dos laudos e imagem das ressonâncias presentes no prontuário do paciente ou disponibilizados pelo Laboratório de Imagem Ultramed Londrina, PR.

4.6 Avaliação da Depressão

A avaliação da depressão foi realizada pela HADS, validada para a língua portuguesa por Botega e colaboradores (1995). Trata-se de uma escala desenvolvida por Zigmond e Snaith (1983) para avaliar os níveis de ansiedade e depressão em indivíduos com doenças físicas e em tratamento ambulatorial. É constituída por 14 itens - 7 avaliam ansiedade e 7 avaliam depressão. Cada um dos itens é pontuado de 0,0 a 3,0 e atinge uma pontuação máxima de 21,0 pontos. O ponto de corte adotado como indicativo de ansiedade ou depressão foi de ≥ 8,0 pontos, com sensibilidade de 90,0% e especificidade de 87,3% (ZIGMOND E SNAITH, 1983; HONARMAND e FEINSTEIN 2009). Todos os indivíduos foram entrevistados utilizando a escala HADS onde era realizada a leitura de cada pergunta e as opções de resposta, sem imposição de limite de tempo para respondê-la. Todas as entrevistas foram realizadas pelo mesmo examinador, no mesmo ambiente e no período vespertino.

4.7 Avaliação da dependência de nicotina

O diagnóstico da dependência de nicotina foi realizado pelos critérios revisados do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision – DSM IV-TR*) (ZABEL, 1995).

4.8 Medicamentos para o tratamento da esclerose múltipla

Os dados sobre os medicamentos utilizados pelos pacientes com EM foram obtidos por consulta aos prontuários médicos e entrevista durante o atendimento ambulatorial. A maioria dos pacientes (n=173) era tratada com drogas modificadoras da atividade da doença como IFN- β 1a (n=148), acetato de glatiramer (n=24) ou natalizumabe (n=1). Foi registrado, também, o uso de

glicorticóides e antidepressivos (fluoxetina, nortriptilina, sertralina ou amitriptilina) em alguns pacientes. Ausência de tratamento para EM foi registrada em 31 pacientes, que abandonaram a terapia ou eram virgens de tratamento no momento da coleta de material biológico.

4.9 Coleta de sangue

Amostras de sangue periférico dos indivíduos envolvidos na pesquisa foram obtidas de acordo com protocolo de Teunissen e colaboradores (2011). As amostras foram coletadas com o sistema de coleta a vácuo em tubos com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) como anticoagulante e em tubos sem anticoagulante após 12 horas de jejum. Após a coleta, as amostras foram identificadas com número para garantir a confidencialidade e o material foi imediatamente centrifugado a 3000 r.p.m por 15 min. Plasma, soro e *buffy-coat* foram aliquotados em tubos tipo *ependorf* e armazenados em *freezer* -80°C para posterior análise.

4.10 Polimorfismo genético *NcoI* do *TNF-β*

O DNA genômico foi extraído com o kit de extração de DNA com coluna de resina (Biopur Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Paraná, Brasil) de acordo com instruções do fabricante, com algumas modificações, como o volume de *buffy-coat* utilizado (200 µL) e a temperatura do tampão de eluição (70°C). A presença e integridade do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado na presença de luz ultravioleta (UV), comparando a um DNA padrão.

Um fragmento de 782 pares de base (pb) do gene *TNF-β* foi amplificado utilizando a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) de acordo com dados descritos na literatura (MAJETSCHAK, et al., 1999; MAJETSCHAK et al., 2002; DELONGUI, et al., 2011) com algumas modificações. Os *primers* foram desenhados de acordo com *GenBank* número X02911 (MAJETSCHAK et al., 1999). O *Primer 1* (*TNFB1 sense*) é formado pela sequência 5' CCG TGC TTC GTG CTT TGG GAC TA 3' e o *Primer 2* (*TNFB2 antisense*) é formado pela sequência 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 1,5 uL de cada *primer* 2,5 mM, 0,75 uL MgCl₂ 50 mM de, 2 uL de dNTP 1,25 mM (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 0,25 uL da enzima DNA polimerase recombinante 1,25 U diluída em 2,5 uL de tampão da enzima (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e 2,0 µL da amostra de DNA com 50-100 ng. A reação de amplificação foi realizada em termociclador PCR Sprint-Thermo Hybaid® (Biosystems, Barcelona, Espanha), com um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C; seguido por 37 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 67°C para o anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, com posterior 10 minutos a 72°C para a extensão final. Um controle negativo (sem amostra de DNA) e um positivo (com DNA) foi incluído em cada bateria de PCR. O

produto de amplificação foi avaliado pela eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando um marcador de 100 pb (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), corado com brometo de etídio e visualizado em presença de luz UV com o sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

Dez microlitros do produto de PCR foi completamente digerido com 0,3 µL de enzima de restrição recombinante *NcoI* 10 U/µL (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) com incubação em banho-maria a 37°C por 4 horas. Os fragmentos da digestão enzimática foram analisados pelo método de RFLP em eletroforese com gel de agarose 3% (70V, 70 minutos), seguida de coloração com brometo de etídio (MAJETSCHAK, et al., 1999; MAJETSCHAK et al., 2002; DELONGUI, et al., 2011). O alelo G (TNFB1) inclui o sítio de restrição da enzima *NcoI* e apresenta um fragmento de 196 pb e outro de 586 pb; o alelo A (TNFB2) com ausência do sítio de restrição apresenta um único fragmento de 782 pb. Com isto, 3 genótipos são determinados: GG (TNFB1/B1, fragmentos 586 pb e 196 pb), GA (TNFB1/TNFB2, com fragmentos 782 bp, 586 bp e 196 bp) e AA (TNFB2/B2, com fragmento 782 pb). As imagens foram capturadas e armazenadas pelo sistema *L-PIX HE* (Loccus Biotecnology, Cotia, Brasil).

4.11 Biomarcadores inflamatórios e anti-inflamatórios

As citocinas IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, TNF-α e IFN-γ foram mensuradas em amostras de soro por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto com reagentes disponíveis comercialmente (eBioscience, San Diego, California, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os limites de detecção para as citocinas foram IL-6= 1,0 ng/mL, TNF-α= 2,0 ng/mL, IFN-γ = 2,0 ng/mL, IL-4 = 1,0 ng/mL, IL-10 = 1,0 ng/mL e IL-17 2,0 ng/mL. Os resultados foram expressos em pg/mL e em transformação logarítmica (Ln)

Os níveis séricos de albumina foram determinados por autoanalisador bioquímico (Dimension®, Dade Behring, Deerfield, IL, USA) e os resultados foram expressos em g/dL. Os níveis séricos de PCR foram quantificados por nefelometria ultrasensível (usPCR) (Behring Nephelometer II, Dade Behring, Marburg, Germany), com sensibilidade analítica de 0,175 mg/L e expressos em mg/L. Os níveis séricos de ferritina foram avaliados por ensaio de quimioluminescência de micropartícula (*Chemiluminescence microparticle immunoassay* – CMIA) (Architech® Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA) e expressos em ng/mL. Valores de ferritina > 274,7 ng/mL e > 204,0 ng/mL foram considerados elevados para homens e mulheres, respectivamente, segundo as instruções do fabricante.

4.12 Biomarcadores do estresse oxidativo

4.12.1 Capacidade Antioxidante Total do Plasma (*Total Radical Trapping Antioxidant Parameter*, TRAP)

Determinou-se a capacidade antioxidante total do plasma por meio da técnica do TRAP. Nesta análise, avalia-se a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes no meio que resulta em um parâmetro integrado capaz de revelar alterações no delicado equilíbrio redox existente *in vivo* (VASCONCELOS et al., 2007). Esta técnica quantifica antioxidantes hidro e lipossolúveis presentes no plasma, por meio de quimioluminescência (QL), como descrito por Repetto e colaboradores (1996).

Baseia-se no princípio da adição de um azoiniciador ao plasma, substância capaz de gerar radicais livres, que por sua vez, são neutralizados pelos antioxidantes presentes no plasma, 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 a capacidade antioxidante total do plasma. Os valores de TRAP foram corrigidos pelos níveis de AU (VENTURINI et al, 2012) e os resultados foram expressos pela razão TRAP/AU. A determinação do AU foi realizada em autoanalisador bioquímico (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA) segundo as recomendações e valores de referência do fabricante e os valores foram expressos em mg/dL.

4.12.2 Determinação de hidroperóxidos lipídicos iniciados por t-butil (CL-LOOH)

A avaliação da formação de lipoperóxidos no plasma pelo método de QL foi efetuada em uma adaptação da técnica descrita por Gonzales-Flecha e colaboradores (1991). A QL estimulada por t-butil hidroperóxido (CL-LOOH) foi empregada para analisar a integridade dos mecanismos de defesa antioxidantes não enzimáticos e os níveis de lipoperóxidos presentes no plasma. O teste baseia-se na premissa de que um aumento de QL está relacionado com um estresse oxidativo prévio sofrido pelo tecido, levando ao consumo das defesas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como vitamina E, com formação de lipoperóxidos, resultando em um aumento da emissão de fótons. Foi utilizado um contador β marca Beckman® modelo LS 6000, (Fullerton, California, EUA), que possui um modelo de contagem não coincidente por 30 segundos, com uma faixa de resposta entre 300 e 620 nM. As análises foram efetuadas em frascos de plástico para cintilação e protegidas da luz. Os resultados foram medidos em contagem por minuto (c.p.m.)

4.12.3 Determinação dos produtos avançados da oxidação proteica (AOPPs)

AOPPs foram determinados em amostras de plasma usando o método descrito por Witko-Sarsat e colaboradores (1996). AOPPs resultam da oxidação de resíduos de aminoácidos como a tirosina, levando a formação de produtos de proteínas contendo ditirosina detectados por

espectrofotometria. Os níveis de AOPPs foram expressos em micromol/litro ($\mu\text{mol/L}$) de equivalente de T cloramina.

4.12.4 Determinação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)

Os NOx foram determinados no plasma por espectrofotometria de acordo com a reação de Griess, com algumas modificações (PANIS et al., 2011). Esta técnica utiliza o grânulo de cádmio para reduzir nitrato a nitrito, o qual é quantificado ao formar um complexo colorido com reagente de Griess. Os resultados foram expressos em μM .

4.12.5 Determinação de proteínas carbonílicas

O conteúdo carbonílico de proteínas é amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo em proteínas, sob condições de estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007). O método utilizado para sua quantificação no plasma foi espectrofotométrico, baseado na reação da 2,4 dinitrofenilhidrazina com o grupo carbonila, formando a 2,4 dinitrofenilhidrazona (REZNICK, PACCKER, 1994). Os resultados foram expressos em $\text{nmol mL}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteínas totais.

4.13 Análise Estatística

As análises de contingência (teste χ^2) foram utilizadas para verificar as associações entre as variáveis categóricas e grupos de diagnóstico. Foram avaliadas as diferenças das variáveis contínuas entre os grupos utilizando análises de variância (ANOVA), seguidas pelo teste de Tukey para examinar as comparações múltiplas entre médias de grupos. As variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e o percentual (%), e as variáveis contínuas foram expressas como média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis. Transformações logarítmicas (Ln) de dados contínuos foram utilizadas nas análises quando as variáveis não apresentaram distribuição normal ou quando não havia heterogeneidade da variância (conforme avaliado com o teste de Levene).

Odds ratio (OR) e intervalo de confiança (IC) de 95% foram calculados. Análises de regressão logística multinomial graduais automáticas foram utilizadas para definir as variáveis significativas (IC de 95%) utilizando as variáveis com valor de $p < 0,1$. Foi utilizada, também, a análise multivariada linear (*Multivariate general linear model*-GLM) para determinar os biomarcadores preditores para o diagnóstico de EM. A análise estatística foi realizada com SPSS para Windows, versão 20.0 (SPSS Inc., CHIGADO, IL, EUA). A significância estatística foi definida como $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em dois artigos científicos descritos a seguir. O primeiro artigo avalia o polimorfismo genético *NcoI* do TNF- β ,

marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo como possíveis preditores da incapacidade e progressão da EM, tendo como base um modelo estatístico proposto pelo grupo de pesquisa em EM na UEL. O mesmo foi publicado no periódico *Molecular Neurobiology* (ISSN: 0893-7648, fator de impacto de 5,397) em janeiro 2017, v. 54, n. 1, páginas 31-44 (doi: 10.1007/s12035-015-9648-6). O segundo artigo avalia estas mesmas variáveis como possíveis preditores da depressão em pacientes com EM, publicado no periódico *Molecular Neurobiology* (ISSN: 0893-7648, fator de impacto de 5,397) em outubro de 2016, v.53, n. 8, páginas 5191-5202 (doi: 10.1007/s12035-015-9443-4).

Artigo 1

KALLAUR AP, REICHE EM, OLIVEIRA SR, SIMÃO AN, PEREIRA WL, ALFIERI DF, FLAUZINO T, PROENÇA CM, LOZOVYOY MA, KAIMEN-MACIEL DR, MAES M. Genetic, immune-inflammatory, and oxidative stress biomarkers as predictors for disability and disease progression in multiple sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 54(1):31-44. 2017. doi: 10.1007/s12035-015-9648-6.

Artigo 2

KALLAUR AP, LOPES J, OLIVEIRA SR, SIMÃO AN, REICHE EM, DE ALMEIDA ER, MORIMOTO HK, DE PEREIRA WL, ALFIERI DF, BORELLI SD, KAIMEN-MACIEL DR, MAES M. Immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers of depression symptoms in subjects with multiple sclerosis: increased peripheral inflammation but less acute neuroinflammation. *Molecular Neurobiology*, 53(8):5191-202, 2016. doi: 10.1007/s12035-015-9443-4.

Genetic, Immune-Inflammatory, and Oxidative Stress Biomarkers as Predictors for Disability and Disease Progression in Multiple Sclerosis

Ana Paula Kallaur¹ · Edna Maria Vissoci Reiche² · Sayonara Rangel Oliveira¹ ·
Andrea Name Colado Simão² · Wildea Lice de Carvalho Jennings Pereira^{1,3} ·
Daniela Frizon Alfieri¹ · Tamires Flauzino¹ · Caio de Meleck Proença³ ·
Marcell Alysson Batisti Lozovoy² · Damacio Ramón Kaimen-Maciél^{3,4} · Michael Maes^{5,6}

Received: 28 September 2015 / Accepted: 17 December 2015 / Published online: 5 January 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract The aim of this study was to evaluate the *TNFβ NcoI* polymorphism (rs909253) and immune-inflammatory, oxidative, and nitrosative stress (IO&NS) biomarkers as predictors of disease progression in multiple sclerosis (MS). We included 212 MS patients (150 female, 62 male, mean (±standard deviation (SD)) age = 42.7 ± 13.8 years) and 249 healthy controls (177 female, 72 male, 36.8 ± 11 years). The disability was measured the Expanded Disability Status Scale (EDSS) in 2006 and 2011. We determined the *TNFβ NcoI* polymorphism and serum levels of interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor (TNF)-α, interferon (IFN)-γ, IL-4, IL-10, and IL-17, albumin, ferritin, and plasma levels of lipid hydroperoxides (CL-LOOH), carbonyl protein, advanced oxidation protein products (AOPPs), nitric oxide metabolites (NOx), and total

radical-trapping antioxidant parameter (TRAP). The mean EDSS (±SD) in 2006 was 1.62 ± 2.01 and in 2011 3.16 ± 2.29, and disease duration was 7.34 ± 7.0 years. IL-10, TNF-α, IFN-γ, AOPP, and NOx levels were significantly higher and IL-4 lower in MS patients with a higher 2011 EDSS scores (≥3) as compared with those with EDSS < 3. The actual increases in EDSS from 2006 to 2011 were positively associated with TNF-α and IFN-γ. Increased IFN-γ values were associated with higher pyramidal symptoms and increased IL-6 with sensitive symptoms. Increased carbonyl protein and IL-10 but lowered albumin levels predicted cerebellar symptoms. The *TNFB1/B2* genotype decreased risk towards progression of pyramidal symptoms. Treatments with IFN-β and glatiramer acetate significantly reduced TNF-α but did not affect the other IO&NS biomarkers or disease progression. Taken together, IO&NS biomarkers and *NcoI TNFβ* genotypes predict high disability in MS and are associated with different aspects of disease progression. New drugs to treat MS should also target oxidative stress pathways.

✉ Edna Maria Vissoci Reiche
reiche@sercomtel.com.br

¹ Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná 86.038-440, Brazil

² Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Av. Robert Koch, 60, Londrina, Paraná CEP 86.038-440, Brazil

³ Outpatient Clinic for Demyelinating Diseases, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná 86061-335, Brazil

⁴ Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná 86.038-440, Brazil

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

⁶ Department of Psychiatry, King Chulalongkorn Memorial Hospital, Chulalongkorn, Bangkok, Thailand

Keywords Multiple sclerosis · Disability · *TNFβ NcoI* polymorphism · Cytokines · Oxidative stress · Pyramidal symptoms

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a progressive chronic inflammatory disorder of the central nervous system (CNS), characterized by immune-mediated damage to cells in the white and gray matter of the brain, spinal cord, and optic nerve [1]. MS is mediated by a T cell-dependent process that is associated with macrophage-mediated demyelination driven by myelin

specific auto-antigens [2]. However, the inflammatory process involves many other immune cells, such as Th1, Th17, and B cells, which interact in a collaborative fashion. Accumulating evidence has brought B cells into focus as critical players in MS pathogenesis. Several autoantibodies are formed against different CNS components, such as neurons and glia, and even immune cells, thus indicating the complex heterogeneity of the disease [3]. Furthermore, IgG is synthesized intrathecally in MS patients [4], and IgG and complement are characteristic features of both type 2 and active MS lesions [5–7]. Memory B cells can differentiate into CSF plasmablasts which are responsible for production of oligoclonal bands, a long-standing hallmark of MS diagnosis observed in over 95 % of MS patients [8]. Moreover, plasma cells were found the infiltrates in classical active plaques of acute and relapsing MS that become increasingly prominent with chronicity of the disease [9]. Nevertheless, there are other central mechanisms by which B cells contribute to MS pathology. Reactivation of memory B cells within the CNS can induce complement-mediated damage to myelin as well as local activation of T cells; T cells, in turn, contribute to B cell proliferation and differentiation [10].

However, pathogenesis of MS is incompletely understood and involves complex interactions between genetic susceptibility and environmental triggers, as well as gene-environment interactions and epigenetic mechanisms [11].

Variations in genes coding for the expression and regulation of cytokines and their receptors may play a role in MS susceptibility and disease progression [12, 13]. The pro-inflammatory cytokines that are most implicated in the pathophysiology of MS are tumor necrosis factor (TNF)- α and TNF- β [1, 14–17]. Their genes are tandemly located within the major histocompatibility complex class III (MHC III) on the short arm of human chromosome 6, suggesting that these genes may be in linkage disequilibrium with the *HLD-DR* loci that are associated with MS [18].

A single nucleotide polymorphism (SNP) at position +252 located in the first intron of the *TNF β* , named as *NcoI* polymorphism (*TNF β* G252A, rs909253), consists of a guanine (G) in the allele *TNFB1* and of an adenine (A) in the variant allele *TNFB2* [19]. Studies have shown that *TNF β* genetic polymorphism is important since variations in the region responsible for transcriptional regulation may have implications for the TNF- α expression and variability on TNF- α synthesis [19–22], which could be an important factor in the pathogenesis of MS.

Furthermore, growing evidence indicates that immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways play a major role in the pathogenesis of MS. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) might play a key role in disease development by contributing to myelin and oligodendroglia degeneration, which are pathological hallmarks of MS [23]. There is increasing

evidence that relapsing-remitting and progressive clinical phases of MS are caused by distinct mechanisms; for example, focal inflammation is associated with the onset of relapses, whereas diffuse axonal degeneration may contribute to disease progression. Oxidative stress in MS is thought to contribute to both processes [24, 25]. Magnetic resonance imaging (MRI) techniques have provided further knowledge on the pathology of MS showing that damage to white and gray matter structures plays a role in developing the disability [26–28]. Tedeschi et al. [29] showed that baseline gray matter atrophy and Expanded Disability Status Scale (EDSS) were the best long-term (9-year follow-up) predictors of clinical disease progression in relapsing-remitting MS (RRMS) patients. Kearney et al. [30] showed that spinal cord and brain atrophy are both relevant, contributing independently to long-term disability in relapse onset.

Understanding the causes of long-term disability in MS is a key of current research, and it is important to monitor and to treat the patients. To clarify this issue, the aim of the present study was to evaluate the *TNF β* *NcoI* polymorphism (rs909253) and IO&NS biomarkers as potential predictors for susceptibility to MS, disability, and disease progression.

Materials and Methods

Study Design

The protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the State University of Londrina, Southern Brazil, and a written consent form was obtained from all of the individuals.

Demographic and Clinical Data

Two hundred and twelve patients with MS were consecutively recruited from the Demyelination Diseases Outpatient of the Specialized Outpatient of University Hospital, State University of Londrina, Southern Brazil. The patients were diagnosed according to the revised McDonald criteria [31, 32]. MS clinical forms were determined as RRMS and progressive clinical forms that included primary progressive MS (PPMS) and secondary progressive MS (SPMS). Demographic and clinical data were obtained using a standard questionnaire and medical records. Anthropometric measurements, such as body weight (measured to the nearest 0.1 kg using an electronic scale, with individuals wearing light clothing, but no shoes) and height (measured to the nearest 0.1 cm using a stadiometer), were evaluated. Body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared; waist circumference (WC) was measured and expressed in centimeter. Ethnicity was classified according to individual's self-perception in Caucasian and non-Caucasian [33, 34].

Age at onset of MS was based on retrospective data from medical records [31]. The disability was evaluated using the EDSS at baseline (EDSS 2006), at the same period of blood sample collection, and 5 years later (EDSS 2011) [35]. Patients were divided into those with mild disability (EDSS 2011 < 3) or moderate or high disability (EDSS 2011 \geq 3). We used two measures of disease progression: (a) the delta values (EDSS 2011–EDSS 2006) by at least one full point for patients with a baseline score of <6.0 and a worsening by at least one-half point for patients with a baseline of 6.0 or higher [36] and (b) the residualized values computed by means of regression analysis with EDSS 2011 as dependent variable and EDSS 2006 as explanatory variable. With these criteria, the patients were divided into those with a progressive or non-progressive course.

MRI revealed the lesion location (brain, spinal cord, and optic nerve) and the presence or absence of gadolinium contrast-enhancing lesions. Most but not all of the patients ($n = 173$) were treated, the majority with interferon beta (IFN- β , $n = 148$) and others with glatiramer acetate ($n = 25$). Some patients were also treated with glucocorticoids and natalizumab. Patients without treatment ($n = 31$) were those who abandoned therapy or were drug naïve at the moment of blood collection. All of the MS patients were in the remission clinical phase, defined as the period of recovery with no relapse episodes within the last 3 months prior to the time of enrollment in the study.

The control group consisted of 249 healthy blood donors from the Blood Bank of Londrina, with similar demographic characteristics and from the same geographic area. Control individuals were excluded when they presented clinical symptoms of inflammation or blood-transmitted infections as screened according to governmental procedures [37], MS, and other autoimmune diseases.

Blood Samples

Peripheral blood samples were collected with EDTA as anticoagulant and without anticoagulant after 12-h fasting. All samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and the buffy coat, plasma, and serum aliquots were stored at -80°C in a freezer for posterior analyses according to a consensus protocol [38]. The samples were consecutively identified by number to guarantee the confidentiality.

TNF β *NcoI* Genetic Polymorphism

The genomic DNA was extracted from the buffy coat using column resin method (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil), according to the manufacturer's instructions. DNA was amplified using polymerase chain reaction (PCR) with primers determined according to the GenBank number X02911 as follows: sense 5' CCG TGC TTC GTG CTT

TGG GAC TA 3' and antisense 5' AGA GGG GTG GAT GCT TGG GTT TC 3' (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), as previously reported [22, 39, 40]. PCR conditions were performed in a thermocycler (PCR Sprint-Thermo Hybaid™, Biosystems, Barcelona, Spain) that comprised 5 min denaturation at 94°C for initial denaturation: 37 cycles of 45 s at 94°C for denaturation, 45 s at 67°C for the annealing and 45 s at 72°C for the elongation, and 10 min at 72°C for final elongation. The amplified fragment of 782 base pairs (bp) was completely digested with *NcoI* restriction enzyme (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 4 h at 37°C . The *NcoI* genotypes were identified by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in a 3 % agarose gel electrophoresis (70 V, 70 min) and stained with ethidium bromide according to previous studies [22, 40]. The *TNFB1* allele includes a restriction site for *NcoI* and results in 196- and 586-bp fragments after digestion, and the *TNFB2* allele (lacking the restriction site for *NcoI*) results a fragment with 782 bp. The heterozygous genotype *TNFB1/B2* results in three fragments (782, 586, and 196 bp).

IO&NS Marker Measurements

Serum levels of pro-inflammatory (interleukin (IL)-6, and TNF- α), Th1 (IFN- γ), Th2 or Treg (IL-4 and IL-10), and Th17 (IL-17) cytokines were measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, California, USA). The limit of detection for these cytokines was defined according to the manufacturer's instructions (IL-6 1.0 ng/mL, TNF- α 2.0 ng/mL, IFN- γ 2.0 ng/mL, IL-4 1.0 ng/mL, IL-10 1.0 ng/mL, and IL-17 2.0 ng/mL). The results were expressed as mean values (\pm standard deviation (SD)) of the cytokine values in logarithm transformation (Ln).

The serum levels of albumin were determined using a biochemical autoanalyzer (Dimension™ Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA), and the results were expressed as gram per deciliter; the serum levels of ferritin were determined using chemiluminescence microparticle immunoassay (CMIA, Architect™, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA), and the results were expressed as nanogram per milliliter.

Plasma levels of *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence (CL-LOOH) were evaluated as described previously [41], and the results were expressed in counts per minute (cpm). Carbonyl protein content was measured as an estimate of protein oxidative injury, as described elsewhere [42]. Protein oxidation was evaluated through the advanced oxidation protein products (AOPP), as previously described [43], and the results were expressed as micromoles per liter of chloramine-T equivalents. Plasma levels of nitric oxide metabolites (NOx) were assessed by nitrite (NO_2^-) and nitrate (NO_3^-) concentration according to the Griess reaction supplemented by the reduction of nitrate to nitrite with cadmium

[44], and the results were expressed in micromolar. Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) was determined as reported previously [45]. Briefly, this method detects hydrosoluble and/or lyposoluble plasma antioxidants by measuring the chemiluminescence inhibition time induced by 2,2-azobis (2-amidinopropane). The system was calibrated with the vitamin E analog Trolox, and TRAP values were expressed in equivalent of micromolar Trolox.

Statistical Analysis Methods

Associations between two classification systems were ascertained with analysis of contingency tables (χ^2 test). Differences in continuous variables among group means were checked with analyses of variance (ANOVA). We used automatic multivariate general linear model (GLM) analysis to examine the associations between dependent variables (e.g., EDSS or pyramidal, cerebellar, and sensitive symptoms) and different explanatory variables (e.g., sex, age, the IO&NS variables). Automatic linear regression analysis was used to delineate the significant predictor variables for dependent variables, including the EDSS and pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms. All tests were two-tailed, and a p value of 0.05 was used for statistical significance. We used IBM SPSS, windows version 22, to analyze the data.

Results

Baseline Characteristics of MS Patients According to Their EDSS

The MS patients were 150 female and 62 male, with mean (\pm standard deviation (SD)) age of 42.7 ± 13.8 years, while the healthy controls were 177 female and 72 male, with mean 36.8 ± 11 years. The mean EDSS (\pm SD) in 2006 was 1.62 ± 2.01 and in 2011 3.16 ± 2.29 , and disease duration was 7.34 ± 7.0 years. Table 1 shows sociodemographic data and biomarkers in controls and MS patients divided into those with an EDSS <3 versus an EDSS ≥ 3 . Age was significantly higher in subjects with a higher EDSS (i.e., ≥ 3) versus controls and MS subjects with a lower EDSS score (i.e., EDSS <3). There were no significant differences in age between controls and MS patients with a lower EDSS score. Likewise, duration of illness was significantly higher in subjects with a higher EDSS than in those with a lower EDSS. There were no significant differences in gender ratio and ethnicity between the three study groups. There were more relapsing-remitting subjects in those with a higher EDSS score than in those with a lower EDSS score. No significant differences in white matter lesions or gadolinium positivity were detected between the two MS subgroups. There were no significant associations between the three diagnostic groups and

the genotype/allelic frequencies. There were no significant differences in the drug status between the two MS subgroups.

Table 1 shows also the differences in the cytokine levels between the two subgroups of patients with MS. These analyses were performed only on the MS patients with the aim to examine the contrasts between patients with higher versus lower EDSS values. In order to control for possible effects of the drug status of the patients, we carried out a multivariate GLM analysis with the six cytokine levels (in Ln transformations) as dependent variables and the two EDSS groups and the drug status (entered as no drugs, IFN- β , and glatiramer) and their two-way interaction as explanatory variables. We found a significant effect of diagnosis ($F=4.00$, $df=6/130$, $p=0.001$) and drug status ($F=2.51$, $df=12/262$, $p=0.004$) but no significant interaction ($F=1.74$, $df=12/262$, $p=0.059$). Table 1 shows the tests of between-subject effects: IL-10, TNF- α , and IFN- γ were significantly higher and IL-4 significantly lower in MS patients with an increased EDSS score as compared with patients with a lower score. There were no significant differences in IL-6 or IL-17 between both groups. Tests of between-subject effects for the drug status showed a significant effect on TNF- α only ($F=6.31$, $df=2/135$, $p=0.002$). Thus, patients treated with IFN- β (1.19 ± 0.09 pg/mL; $p=0.001$) and those treated with glatiramer (1.23 ± 0.22 pg/mL; $p=0.01$) showed significantly lower TNF- α levels than those without any treatment (1.99 ± 0.21 pg/mL). There were no significant differences in the effects of IFN- β versus glatiramer ($p=0.840$).

Table 1 shows also the results of the oxidative stress measurements. A multivariate GLM analysis was performed in the MS patients only (to control for putative effects of drugs) with lipid hydroperoxide, AOPP, NOx, ferritin, TRAP, and albumin as dependent variables and the two diagnostic MS groups divided according to the EDSS scores, and drug status (entered as: no drugs, IFN- β , glatiramer) and their interaction as explanatory variables showed no significant effect of the drug status ($F=0.47$, $df=12/180$, $p=0.929$). Since there were no significant treatment effects, we have consequently examined the differences in these biomarkers between healthy subjects and the two MS groups. There was a highly significant effect of diagnosis ($F=12.83$, $df=12/474$, $p<0.001$). Table 1 shows the estimated means and SE values obtained in this analysis and the results of the tests of between subject effects. We found significant differences in lipid hydroperoxide, AOPP, NOx, and ferritin between the three groups. Bonferroni-corrected post hoc tests showed higher lipid hydroperoxide values in the two MS groups than in controls. AOPP was significantly lower in those with a lower EDSS score than in controls and MS patients with a higher EDSS score. NOx was significantly lower in the two MS groups than in controls and lower in those

Table 1 Baseline characteristics of multiple sclerosis patients with low and increased Expanded Disability Status Scale (EDSS) values and healthy controls

Variables	Controls ^a	EDSS < 3 ^b	EDSS ≥ 3 ^c	F or χ^2	df	P value
Age (years)	36.8 (± 11.0) ^c	38.1 (± 12.9) ^c	47.3 (± 13.1) ^{a, b}	30.0	2/458	<0.001
Disease duration (years)	–	5.1 (± 4.8)	9.6 (± 8.1)	23.8	1/210	<0.001
Sex (F/M)	177/72	77/29	73/33	0.37	2	0.830
Ethnicity (NC/C)	50/199	16/90	26/80	2.96	2	0.228
RRMS (no/yes)	–	19/86	42/64	11.89	1	0.001
White matter lesions (no/yes)	–	8/89	13/76	1.87	1	0.171
Positive gadolinium lesions (no/yes)	–	69/28	71/17	2.28	1	0.131
<i>TNFB1B1; B1B2; B2B2</i>	0.09/0.51/0.39	0.06/0.46/0.47	0.08/0.43/0.49	3.51	4	0.477
<i>TNFB1</i> allele	0.35	0.29	0.30	–	–	–
<i>TNFB2</i> allele	0.65	0.71	0.70	2.76	2	0.252
No drugs vs IFN- β vs GA	–	16/76/9	15/72/16	2.08	2	0.353
No drugs vs drugs ^d	–	16/85	15/88	0.07	1	0.799
Ln IL-6 (ng/mL)	0.73 (± 0.08)	0.71 (± 0.16)	0.97 (± 0.16)	1.28	1/135	0.261
Ln IL-4 (ng/mL)	0.14 (± 0.41)	0.81 (± 0.17) ^c	0.27 (± 0.17) ^b	5.17	1/135	0.025
Ln IL-10 (ng/mL)	1.57 (± 0.71)	1.35 (± 0.09) ^c	1.64 (± 0.09) ^b	5.29	1/135	0.023
Ln TNF- α (ng/mL)	1.63 (1.32)	1.13 (± 0.15) ^c	1.82 (± 0.15) ^b	10.69	1/135	0.001
Ln IFN- γ (ng/mL)	3.92 (± 1.65)	3.56 (± 0.18) ^c	4.09 (± 0.17) ^b	4.76	1/135	0.032
Ln IL-17 (ng/mL)	0.94 (± 0.71)	1.06 (0.12)	0.89 (± 0.12)	0.71	1/135	0.492
CL-LOOH (cpm)	16,770 ($\pm 15,788$) ^{b, c}	22,084 (± 8682) ^a	29,239 ($\pm 19,427$) ^a	22.46	2/241	<0.001
AOPP ($\mu\text{mol/L}$ of chloramine-T equivalents)	141.8 (± 61.4) ^b	114.6 (± 43.6) ^{b, c}	134.5 (± 55.3) ^b	6.64	2/241	0.002
NOx (μM)	46.0 (± 26.0) ^{b, c}	21.1 (± 33.9) ^{a, c}	26.2 (± 27.0) ^{a, b}	56.63	2/241	<0.001
TRAP (mM Trolox/UA mg/mL)	721.1 (± 144.6)	651.4 (± 133.9)	680.8 (± 120.0)	2.51	2/241	0.084
Ferritin ($\mu\text{g/L}$)	94.6 (± 90.1) ^{b, c}	199.3 (± 251.0) ^a	237.4 (± 257.6) ^a	16.74	2/241	<0.001
Albumin (g/dL)	4.15 (± 0.31)	4.06 (± 0.39)	3.99 (± 0.46)	2.31	2/241	0.102
Carbonyl proteins (nmol mL ⁻¹ mg ⁻¹ total protein)	–	75.1 (± 18.9)	81.4 (± 19.8)	3.01	1/109	0.086

F female, M male, NC non-Caucasian, C Caucasian, RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, *TNFB1/B1* homozygous genotype for the allele *TNFB1* (with guanine at position +252 in the first intron of the *TNF β* gene), *TNFB2/B2* homozygous genotype for the allele *TNFB2*, with adenine at position +252 in the first intron of the *TNF β* gene, *TNFB1/B2* heterozygous genotype, EDSS Expanded Disability Status Scale, IFN- β , interferon beta, GA glatiramer acetate, Ln logarithm, IL interleukin, IFN- γ interferon gamma, TNF- α tumor necrosis factor alpha, CL-LOOH hydroperoxide concentrations by tert-butyl hydroperoxide-9-initiated chemiluminescence, expressed in count per minute (cpm), AOPP advanced oxidation products protein, NOx nitric oxide metabolites, TRAP total radical-trapping antioxidant parameter

^aThe results differed when compared to controls

^bThe results differed when compared to patients with EDSS < 3

^cThe results differed when compared to patients with EDSS ≥ 3

^dDrugs include interferon beta 1a, interferon beta 1b, glatiramer acetate, and natalizumab. Continuous variables were expressed as mean (\pm standard deviation (SD)) and categorical variables were expressed as absolute number. Cytokines were expressed as logarithm

with a lower EDSS score as compared with those with a higher EDSS score. Ferritin was higher in the two MS groups as compared to controls. A separate GLM analysis was performed on carbonyl proteins (because this assay was performed only in MS patients), but no significant differences between both MS groups could be found.

Effects of Time (from 2006 to 2011) on EDSS Score and MS Symptoms

Table 2 shows the effects of time (from 2006 to 2011) on EDSS score and pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms. Although we used two different methods to divide the patients into those with a progressive versus non-progressive course (see “Materials and Methods”), we here report only on the residualized EDSS values obtained by the regression of EDSS 2011 on EDSS 2006 and using a cutoff value of 0.12. This cutoff value was determined as that value whereby 40 % of the subjects had increased residualized EDSS values. Univariate RM design GLM analysis performed on the EDSS values showed a significant effect of time and a significant interaction between time and course. Table 2 shows the magnitude of increases in EDSS in those with a progressive course as compared to those with a non-progressive course.

Multivariate RM design GLM analysis with the pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms as dependent variables showed that time ($F=23.44$, $df=3/62$, $p<0.001$) and the time \times course (progressive versus non-progressive) interaction ($F=13.94$, $df=3/62$, $p<0.001$) were both significant. Table 2 also shows the results of tests of between-subject effects. There were significant time effects for all three variables and significant interactions time by course for pyramidal and sensitive, but not cerebellar, symptoms.

Factors Associated with the 5-Year Follow-up Progression in the EDSS

Subsequently, we have examined the factors that could possibly affect the 5-year follow-up progression in the EDSS. Table 3 shows the outcome of RM design GLM analyses with significant time \times group or between-group effects. Table 3 shows that only sex had (without p correction) a significant effect on the progression. Ethnicity, relapsing-remitting clinical form, treatment versus no treatment, type of treatment (no treatment versus IFN- β versus glatiramer), glucocorticoids or not, gadolinium positivity, white matter lesions or not, and *NcoI TNF β* genotypes did not affect progression in these RM design GLM analyses. Non-RRMS patients and those treated had significantly higher EDSS values than their counterparts.

Table 4 shows the results of automatic linear regression analyses with EDSS 2011 and the changes in EDSS from 2006 to 2011 (computed as the residualized values obtained by the regression of EDSS 2011 on EDSS 2006) as dependent variables and the IO&NS biomarkers, age, gender, use of drugs, and type of MS as explanatory variables. Consequently, the variables were entered in univariate GLM analyses. The univariate GLM analysis with the effects of the drug status entered as three groups (i.e., no treatment and treatment with IFN- β or glatiramer) showed that 38.4 % of the variance in the EDSS 2011 values was explained by the regression on four variables, i.e., age (positively associated), lipid hydroperoxide (positively associated), drugs, and the interaction term RRMS with drugs. RRMS itself was not significant in this regression analysis. The estimated marginal means showed that in patients with RRMS, the EDSS score was lower in those who were treated with IFN- β (2.54 ± 0.20) and glatiramer (3.74 ± 0.59) than in those without medication (4.11 ± 0.87). In

Table 2 Measurements of the Expanded Disability Status Scale (EDSS), pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms in patients with multiple sclerosis subdivided into a non-progressive course vs those with a progressive clinical course

Variables	Time	Non-progressive ^a	Progressive ^a	Ft or Fi	df	P value
EDSS	2006	1.58 (± 2.04)	1.69 (1.98)	Ft = 565.35	1/209	<0.001
	2011	2.05 (1.99)	4.87 (± 1.55)	Fi = 311.84	1/209	<0.001
Pyramidal symptoms	2006	2.01 (± 1.34)	1.84 (± 1.33)	Ft = 44.87	1/64	<0.001
	2011	1.48 (± 1.09)	3.43 (± 1.47)	Fi = 38.78	1/64	<0.001
Sensitive symptoms	2006	0.43 (± 0.70)	0.35 (± 0.75)	Ft = 8.50	1/64	<0.001
	2011	0.52 (0.91)	1.25 (± 1.25)	Fi = 0.86	1/64	0.613
Cerebellar symptoms	2006	0.40 (± 0.88)	0.42 (± 0.88)	Ft = 25.74	1/64	<0.001
	2011	0.81 (± 1.25)	1.83 (± 1.52)	Fi = 7.95	1/64	0.006

All results are shown as mean (\pm SD). All results of repeated measurement design ANOVAs. Ft and Fi: all results of univariate (EDSS) and multivariate (pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms) repeated measurement design GLM analyses with effects of time (Ft) and the time by course (progressive vs non-progressive) interaction (Fi)

^a Progressive EDSS was defined as residual EDSS values >0.12 (obtained by regression of the 2011 values on the 2006 values)

Table 3 Predictors of progression of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) at baseline (2006) over 5-year follow-up period (endpoint) in patients with multiple sclerosis

Variables	EDSS		<i>F</i> interaction (<i>df</i>)	<i>P</i> value	<i>F</i> groups (<i>df</i>)	<i>P</i> value
	Baseline (2006)	Endpoint (2011)				
Sex						
Male (<i>n</i> = 62)	1.95 (±2.19)	3.19 (±2.57)	6.56 (1/207)	0.011	1.12 (1/207)	0.291
Female (<i>n</i> = 149)	1.49 (±1.95)	3.14 (±2.17)				
Clinical forms						
No RRMS (<i>n</i> = 61)	2.44 (±2.62)	4.09 (±2.65)	0.55 (1/207)	0.460	8.68 (1/207)	0.004
RRMS (<i>n</i> = 150)	1.29 (±1.59)	2.78 (±2.02)				
Therapy						
No (<i>n</i> = 31)	0.95 (±1.61)	2.84 (±2.22)	0.89 (1/199)	0.346	6.06 (1/199)	0.015
Yes ^a (<i>n</i> = 172)	1.77 (±2.08)	3.23 (±2.30)				
Type of therapy						
No drugs (<i>n</i> = 31)	0.95 (±1.61)	2.84 (±2.22)	0.93 (2/197)	0.396	4.76 (2/197)	0.010
IFN-β (<i>n</i> = 147)	1.65 (±2.05)	3.10 (±2.29)				
GA (<i>n</i> = 25)	2.42 (±2.19)	4.04 (±2.26)				

EDSS Expanded Disability Status Scale, RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, IFN-β interferon beta, GA glatiramer acetate

^a Drugs include interferon beta 1a, interferon beta 1b, glatiramer acetate, and natalizumab. All results of univariate repeated measurement design GLM analyses performed on the EDSS measurements in 2006 and 2011 and showing the interactions terms between time and the listed categorical variables (*F* interaction) and the group differences between the groups defined by the categorical variables listed

those with other MS clinical forms, the EDSS score was higher in those who were treated with IFN-β (3.65 ± 0.43) and glatiramer (5.45 ± 0.87) than in those who were not treated (2.15 ± 0.62).

Table 4 also shows the regression of the actual changes in the EDSS (from 2011 to 2006, expressed as the residualized values obtained by regression analysis) on the explanatory variables. The residualized EDSS values were significantly predicted by two explanatory variables, i.e., TNFα and IFN-γ (both positively associated with the changes in EDSS). Forced entry of age ($F = 1.30$, $df = 1/133$, $p = 0.256$), sex

($F = 0.87$, $df = 1/133$, $p = 0.353$), drug status ($F = 0.17$, $df = 1/133$, $p = 0.679$), and clinical forms of MS ($F = 0.04$, $df = 1/133$, $p = 0.846$) were not significant in this regression analysis. Controlling for these variables did not affect the significant levels of TNF-α ($F = 9.49$, $df = 1/133$, $p = 0.003$) and IFN-γ ($F = 4.36$, $df = 1/133$, $p = 0.039$).

Table 5 shows the results of RM design multivariate GLM analyses with the pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms as dependent variables and time and the interactions of time × ethnicity, time × clinical forms of MS, time × sex, and time × *TNFB1/B2* genotype as within-subject variables. We

Table 4 Results of GLM analysis with EDSS 2011 and changes in EDSS 2006 to 2011 as dependent variables

Dependent variable	Exploratory variable	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i> value
EDSS 2011	Model	38.4	9.97	7/112	<0.001
	Age (years)	21.5	30.67	1/112	<0.001
	CL-LOOH (cpm)	4.4	5.16	1/112	0.025
	RRMS	0.31	0.28	1/112	0.595
	Drugs ^a	5.9	3.50	2/112	0.034
	RRMS vs drugs	6.6	3.93	2/112	0.022
Residual EDSS 2011	Model	10.9	8.47	2/139	<0.001
	Ln TNF-α (ng/mL)	8.2	12.44	1/139	0.001
	Ln IFN-γ (ng/mL)	3.4	4.95	1/139	0.028

CL-LOOH hydroperoxide concentrations by *tert*-butyl hydroperoxide-initiated chemiluminescence, expressed in count per minute (cpm), RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, Ln logarithm, IFN-γ interferon gamma, TNF-α tumor necrosis factor alpha

^a Drugs include patients under interferon beta 1a, interferon beta 1b, glatiramer acetate, and natalizumab therapy

Table 5 Results of multivariate repeated measurement design GLM analysis with pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms as dependent variables

Analysis	Dependent variables	Exploratory variables	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i> value
Multivariate	All 3 symptoms ^a	Time	5.90	3/59	0.001
		Time × ethnicity	1.10	3/59	0.355
		Time × RRMS	0.18	3/59	0.910
		Time × sex	0.28	3/59	0.843
		Time × <i>TNFB1/B2</i>	3.43	3/59	0.023
Between-subject effects	Pyramidal symptoms	Time	5.13	1/61	0.027
		Time × <i>TNFB1/B2</i>	7.10	1/61	0.010
	Sensitive symptoms	Time	12.41	1/61	0.001
		Time × <i>TNFB1/B2</i>	1.42	1/61	0.238
	Cerebellar symptoms	Time	5.32	1/61	0.010
		Time × <i>TNFB1/B2</i>	2.91	1/61	0.093

TNFB1/B1 homozygous genotype for the allele *TNFB1* (with guanine at position +252 in the first intron of the *TNFβ* gene), *TNFB2/B2* homozygous genotype for the allele *TNFB2*, with adenine at position +252 in the first intron of the *TNFβ* gene, *TNFB1/B2* heterozygous genotype

^a All symptoms include pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms obtained from Expanded Disability Status Scale (EDSS). Results of multivariate repeated measurement design GLM analyses performed on the pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms and showing the effects of time (from 2006 to 2011) and interactions between time and the listed variables (i.e., ethnicity, R MS, gender, and *TNFB1/B2*)

found that there were significant time and time × *TNFB1/B2* genotype effects. Tests of between-subject effects showed a significant effect of time on pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms and a significant time × *TNFB1/B2* interaction on pyramidal symptoms only. Estimated marginal means shows that in subjects without the *TNFB1/B2* genotype, there was a higher increase (from 1.33 ± 0.19 to 2.47 ± 0.27) in pyramidal symptoms from 2006 to 2011 than in those with the *TNFB1/B2* genotype (from 1.81 ± 0.20 to 2.09 ± 0.29).

Table 6 shows the results of (automatic) linear GLM analysis with the pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms in 2011 or the residualized values (computed by regression of the 2011 on the 2006 values) as dependent variables and age and the IO&NS variables as explanatory variables. We found that 9.6 % of the variance in the endpoint pyramidal symptoms was explained by increasing age and IFN-γ levels. Of the variance in cerebellar symptoms, 17.9 % was explained by the regression on carbonyl proteins and IL-10 (both positive

Table 6 Results of linear regression GLM analysis with pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms as dependent variables

Dependent variable	Exploratory variable	<i>R</i> ² (%)	<i>F</i> / <i>t</i>	<i>df</i>	<i>P</i> value
Pyramidal symptoms	Model	9.6	<i>F</i> , 12.20	2/105	0.005
	Age (years)		<i>t</i> , 2.58		0.011
	Ln IFN-γ (ng/mL)		<i>t</i> , 2.07		0.041
Cerebellar symptoms	Model	17.9	4.65	3/64	0.005
	Carbonyl proteins*		<i>t</i> , 2.59		0.012
	Albumin (g/dL)		<i>t</i> , -2.46		0.017
	Ln IL-10 (ng/mL)		<i>t</i> , 2.14		0.036
Residual cerebellar symptoms	Model	23.6	<i>F</i> , 5.39	2/35	0.009
	Carbonyl proteins*		<i>t</i> , 2.96		0.006
	Ln IL-10 (ng/mL)		<i>t</i> , 2.04		0.050
Sensitive symptoms	Model	9.5	<i>F</i> , 5.95	2/113	0.003
	Ethnicity		<i>t</i> , 2.21		0.029
	Ln IL-6 (ng/mL)		<i>t</i> , 2.21		0.029

Pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms are functional parameters obtained from Expanded Disability Status Scale (EDSS). Carbonyl proteins were expressed as nanomole per milliliter per milligram total protein Ln logarithm, *IL* interleukin, *IFN-γ* interferon gamma

associations) and albumin (negative association) levels. The changes in cerebellar symptoms from 2006 to 2011 were predicted by increasing levels of protein carbonyls and IL-10. The endpoint levels of sensitive symptoms were significantly predicted by IL-6 and ethnicity. Sensitive symptoms were higher in non-Caucasians (1.28 ± 0.21) as compared with Caucasians (0.75 ± 0.12). Forced entry of age, sex, drug status, and clinical forms of MS in all analyses displayed in Table 6 showed that these variables were not significant in this regression analysis.

Discussion

The first interesting finding of this study is that there is a significant progression in disability and severity of pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms over a 5-year period and that the significant increase in the EDSS score is associated with increases in pyramidal and cerebellar, but not sensitive, symptoms. One obvious consequence of MS progression is a cumulative loss of muscle control. Sensory relapses are more frequent in early or non-progressive disease. Pyramidal and cerebellar relapses are more common in progressive disease, while sensory relapses show a better recovery than other relapse phenotypes [46]. In the present study, we have also examined sociodemographic and clinical characteristics of disease progression. There have been only a limited number of studies delineating predictors of relapse activity [47–49].

These studies suggested several predisposing factors, such as sex, age, ethnicity, and time from MS onset. However, their outcomes, in particular those related to effect of sex on relapse incidence, have often been discordant. In our study, there was without *p* correction a significant greater effect on disease progression in females than in males. These effects of sex however were no longer significant after considering the effects of other variables in multivariate analyses. Interestingly, a retrospective cohort study of predictors of relapse incidence showed 14.3 % higher annualized relapse rates in females than in males [50]. Another study [51] also confirmed this observation by demonstrating a similar sex effect of 17.7 % in the annualized relapse rate among MS patients. All in all, our results may show that the mild effect of sex is mediated by other factors, such as differences in IO&NS responses between men and women [52–54].

We found that increasing age was a strong predictor of the EDSS and pyramidal dysfunction scores but was not significantly associated with the actual changes in the EDSS, pyramidal, sensitive, or cerebellar symptoms. Previous studies have shown that age at onset of symptoms is a major prognostic factor of disease progression with an older age at onset being associated with a poorer disease outcome [55, 56] and a more rapid development of the progressive phase of the disease [36, 57, 58]. Kalincik et al. [51] have confirmed the

inverse relationship between relapse frequency and either disease duration or age.

We could not detect significant effects of relapsing-remitting clinical form, type of treatment (no treatment versus IFN- β versus glatiramer), glucocorticoids, gadolinium positivity, and white matter lesions on disease progression as measured with the EDSS. While these variables did not modulate progression of pyramidal or cerebellar symptoms, ethnicity had a mild but significant effect on the progression of sensitive symptoms showing that non-Caucasians had higher sensitive symptoms than Caucasians [46].

The second and most important finding of this study is that the IO&NS biomarkers together with the *TNF β NcoI* polymorphism (rs909253) significantly predict the EDSS values and/or the actual changes in the EDSS, pyramidal, cerebellar, and sensitive symptoms over a 5-year period. Thus, the EDSS values are significantly predicted by increased TNF- α , IFN- γ , IL-10, AOPP, CL-LOOH, and NOx and lowered IL-4 levels. The actual progression in disease disability, on the other hand, was significantly and positively correlated with TNF- α and IFN- γ concentrations. Increased IFN- γ values were additionally associated with increased pyramidal symptoms. The cerebellar symptom scores were significantly and positively associated with carbonyl protein and IL-10 levels and negatively with albumin levels. The sensitive symptom values were significantly and positively related to higher IL-6 levels. While the *TNF β NcoI* genotypes or allelic variants were not significantly associated with the endpoint or the actual changes in EDSS and cerebellar and sensitive symptom values, the *TNFB1/B2* genotype may decrease risk towards pyramidal symptom progression. These results suggest that different pathophysiological mechanisms may underpin the impairment of functional systems, which play a role in the clinical course and disability progression. Evidence shows that MS-associated neuronal damage, including lesions within the white and gray matter, is associated with activated microglia and chronically increased production of multiple neurotoxic molecules, including IO&NS biomarkers [59–61]. Thus, inflammatory cytokines (such as TNF- α and IFN- γ), ROS and nitric oxide (NO) may drive progressive damage to neurons. We will now discuss these findings on a point by point basis.

In the present study, TNF- α levels were significantly and positively associated with disease progression. Some previous studies showed lowered TNF- α levels in MS patients [62, 63] and a decreased production of TNF- α by stimulated PBMCs from MS patients compared with controls [64]. Such findings may be explained by the knowledge that in MS patients TNF- α is produced and consumed at sites of inflammation, including lesions in brain white matter, spinal cord, and optic nerve [14, 65]. Nevertheless, the higher levels in our patients with higher EDSS values are compatible with the knowledge that TNF- α signaling may be neurotoxic [66, 67] and play a role in MS and neurodegeneration [68]. While TNF- α may

have some neuroprotective activities, this cytokine also exerts neurotoxic effects [66, 69]. Importantly, TNF- α is also detected in astrocytes from demyelinating plaques [6], contributing to white matter destruction at the onset of MS [70].

The positive association between IFN- γ levels and increased EDSS values may indicate increased neurotoxic effects through this Th1 cytokine. Increased IFN- γ production by Th1 cells is one of the factors that play a critical role in MS and its progression [71]. Th1 cells producing IFN- γ are identified in the perivascular infiltrates of MS patients [72]. Adult human astrocytes stimulated with IFN- γ exert potent neurotoxicity in vitro mediated by Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 pathway activation in astrocytes [73]. Moreover, increased IFN- γ production may result in different neurotoxic or excitotoxic effects for example through systemic and central activation of indoleamine-2,3-dioxygenase resulting in increased production of for example quinolinic acid and kynurenine [66].

Our results also show significantly lower serum IL-4 levels in patients with a more severe disease progression. These results are in agreement with the important role of IL-4 as an anti-inflammatory modulator of MS lesion formation [63, 74]. IL-4 is a key cytokine produced by Th2 cells and inhibits Th1 cells for example by decreasing IL-1 and TNF- α production. Administration of IL-4 in EAE exerts a protective effect, while IL-4 upregulation may reduce the severity of EAE [75].

We also found that increased IL-10 levels are associated with an enhanced disease progression. Nevertheless, previous studies have shown that peripheral B cells of MS patients produce lower IL-10 than the same cells in normal controls [76]. Moreover, IL-10 is an important factor in the recovery of EAE [77]. In contrast to Th2 cytokines (IL-4), the absence of IL-10 results in a more severe EAE. Several studies have reported that differential production of IL-10 may be a factor in the severity of MS [77, 78]. The role of Treg cells in MS is a modulation of the inflammation through the IL-10 and TGF- β production. All in all, it appears from our results that disease progression is associated with a Th1, monocytic and Treg response, and a downregulation of Th2 functions. Therefore, the increased IL-10 levels detected here probably reflect a compensatory Treg response that may be regarded as part of a compensatory anti-inflammatory reflex system (CIRS), which aims to attenuate an overzealous inflammatory response [79]. Treg cells, via their immune suppressive capability, play an indispensable role in maintaining immune homeostasis and preventing autoimmunity induced by excessive, misdirected, or unnecessary immune activation. Treg cells contribute to protection against MS. Although investigators have found no differences in the frequency of CD4+CD25^{hi} Treg cells between patients with MS and healthy controls, several groups revealed how CD4+CD25^{hi} Treg cells in MS patients are functionally impaired [80–83].

Another important result of the current study is that increased CL-LOOH levels predict the endpoint EDSS values and that increased carbonyl proteins predict cerebellar dysfunction and the actual changes in cerebellar symptoms over a 5-year period. Previously, we showed an association between oxidative markers and MS with higher plasma levels of for example CL-LOOH [84]. Previously, we have reviewed the different effects of oxidative stress on neurons and brain function including neurodegeneration, neurotoxicity, lowered neurogenesis, and neuroplasticity [85]. Excessive reactive oxygen species may damage lipids and proteins impairing neuronal functions thereby causing neurodegenerative disease [86]. Since lipid peroxidation is a chain reaction, it can, if not rapidly inhibited, easily destroy lipid-rich areas such as cell membranes or myelin sheaths [87]. In addition to the destruction of lipid layers, lipid rafts and related palmitoylation, oxidative modification of fatty acids is accompanied by an increased generation of aldehydes, including malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-nonenal (4HNE) [88], which may further damage the lipid structures and cause neuronal dysfunctions [87]. Moreover, the myelin surrounding the axons consists of 70 % lipids and 30 % proteins and therefore is a target of immune and oxidative stress attacks in MS [89]. Following immune and oxidative damage, the neurons may release microglial activators, including matrix metalloproteinase 3, α -synuclein, and neuromelanin, which may cause a self-perpetuating cycle of neurotoxicity known as reactive microgliosis [90]. MS has been associated not only with increased levels of IO&NS biomarkers but also decreased levels of antioxidants, and this imbalance has been implicated in demyelination and axonal damage [91–97]. Nevertheless, in the present study, we were unable to find any significant associations between lowered antioxidant levels (TRAP) and disease progression.

Our results also show that while MS per se is accompanied by lowered AOPP and NOx levels, there were higher AOPP and NOx levels in those with higher EDSS as compared to those with lower EDSS scores. Thus, within the group of MS patients, higher protein oxidation and nitric oxide levels could further endanger neuronal functions. Protein oxidation is known to play a critical role in inflammatory demyelinating diseases [98]. Oxidatively modified proteins are responsible for additional autoimmune responses because oxidatively specific epitopes may be formed that are immunogenic [99, 100]. NO has neuroprotective effects and functions, although at high concentrations, NO is a neurotoxin leading to neurodegeneration including via hypernitrosylation, autoimmune responses directed to NO adducts, and formation of peroxynitrite [100, 101]. NO also causes altered cerebral blood flow and disruption of the neurovascular unit and strongly synergizes with hypoxia to induce neuronal death and excitotoxicity [101, 102]. However, results of NOx serum levels obtained among patients with MS have been

contradictory. While elevated NOx levels were obtained in the CSF, urine, and serum of MS patients [92], lower plasma levels of NOx were obtained from MS patients than from controls [84, 91]. One hypothesis that may explain our findings is that the lowered levels of NOx in MS are explained by increased nitrosylation of proteins [103] and that the higher NOx levels associated with increased EDSS scores suggest increased neurotoxic effects of NO and subsequent hypernitrosylation and autoimmune responses to NO adducts [100].

Finally, we found that the *TNFB1/B2* genotype decreased risk towards progression of pyramidal symptoms. The *TNFβ NcoI* polymorphism resides within intron 1 and is associated with the exon 3 polymorphism affecting *TNFβ* gene expression levels [19]. The combination of these allelic forms may lead to different levels of cytokine production in response to various physiological and pathological stimuli and in turn may result in increased vulnerability to MS [17]. In a previous study, the *TNFB2* allele was associated with the presence of MS in Caucasian Southern Brazilian patients and the *TNFB2/B2* genotype was associated with increased TNF- α serum levels in these patients [104]. Therefore, this polymorphism could be an important gene candidate not only for the susceptibility and pathogenesis of MS [104] but also for progression of neurologic symptoms.

A third finding is that the disease modifying drugs (DMDs) used in our study had a significant suppressant effect only on TNF- α , whereas the other cytokines and O&NS biomarkers were not affected by DMD treatment. IFN- β decreases the production of pro-inflammatory cytokines, including but not limited to TNF- α , while increasing that of IL-10 [64]. Most importantly, there were no significant effects of treatments with DMDs, either glatiramer acetate or IFN- β , on the actual changes in the EDSS score and the progression in pyramidal, sensitivity, and cerebellar symptoms. Unexpectedly, the progression in the EDSS score was the same in those treated or not suggesting that DMD treatments do not improve disease progression over a 5-year period. Randomized clinical trials show a significant efficacy of DMDs in rapid-onset MS as indicated by lowered relapse frequency and a reduction of acute neuro-inflammation [105]. There is less evidence that DMDs may prevent or delay neurological disability progression [105]. Nevertheless, the latter authors reported that DMDs are effective in delaying EDSS progression in MS patients especially in those with RRMS. In our study, the progression in neurological disabilities was assessed as the residualized EDSS values after partialling out all effects of baseline EDSS values. This is a more sound method than using for example Δ values subtracting baseline from the end-point values because our method assures that only the actual changes in EDSS are considered independently from the baseline EDSS values. Since DMDs did not affect the oxidative

stress biomarkers and the latter predict disease progression, we propose that new treatments of MS should also target oxidative stress pathways.

Conclusions

This study showed that IO&NS biomarkers were associated with different indexes of disease progression including overall disability of MS as assessed with the EDSS score and specific target symptoms, including progression of pyramidal, sensitive, and cerebellar symptoms. The main strong point of the present study is that we used multivariate statistical analyses to evaluate the association between the actual changes in disease progression and IO&NS biomarkers by adjusting for possible effects of many background variables, including the drug state of the patients.

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

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Kamali-Sarvestani E, Nikseresht A, Aflaki E, Sarvari J, Ghareis-Fard B (2007) TNF- α , TNF- β and IL-4 polymorphisms in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 115:161–166
2. Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K (2010) Mechanisms of oxidative stress damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis* 2011:1–11
3. Fraussen J, Claes N, de Bock L, Somers V (2014) Targets of the autoimmune response in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 13:1126–1137
4. Kabat EA, Moore DH, Landow H (1942) An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J Clin Invest* 21:571–577
5. Lumsden CE (1971) The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res* 28:365–390
6. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47:707–717
7. Breyer EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R et al (2008) Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol* 63:16–25
8. von Budingen HC, Gulati M, Kuenzle S, Fischer K, Rupprecht TA, Goebels N (2010) Clonally expanded plasma cells in the

- cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce 'oligoclonal bands'. *J Neuroimmunol* 218:134–139
9. Ozawa K, Suchanek G, Breitschopf H, Brück W, Budka H, Jellinger K, Lassmann H (1994) Patterns of oligodendroglia pathology in multiple sclerosis. *Brain* 117:1311–1322
 10. Reindl M, Kuenz B, Berger T (2010) B-cells and antibodies in MS. *Results Probl Cell Differ* 51:99–113
 11. Voskuhl RR, Gold SM (2012) Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nat Rev Neurol* 8:255–263. doi:10.1038/nrneurol.2012.43
 12. Mäurer M, Kruse N, Giess R, Kyriallis K, Toyka KV, Rieckmann P (1999) Gene polymorphism at position –308 of the tumor necrosis factor α promoter is not associated with disease progression in multiple sclerosis. *J Neurol* 246:949–954
 13. Kallaur AP, Kaimen-Maciel DM, Morimoto HK, Watanabe MAE, Reiche EMV (2011) Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis. *Inter J Mol Med* 28:467–479. doi:10.3892/ijmm.2011.731
 14. Selmaj K, Raine CS, Cannella B, Brosnan CF (1991) Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87:949–954
 15. Vassali P (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factor. *Ann Rev Immunol* 10:411–452
 16. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C et al (1996) A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 13:472–476
 17. Mycko M, Kowalski W, Kwinkowski M, Buenafe AC, Szymanska B, Tronczynska E et al (1998) Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor and lymphotoxin-alpha. *Journal of Neuroimmunol* 84:198–206
 18. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Jarrett-Nedwin J, Pennica D et al (1985) Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 13:6361–6373
 19. Messer G, Spengler U, Jung MC, Messer G, Spengler U, Jung MC et al (1991) Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an *NcoI* polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *J Exp Med* 173:209–219
 20. Ebers CG, Sandovnick AD (1994) The role of genetic factor in multiple sclerosis susceptibility. *J Neuroimmunol* 54:1–17
 21. Sharma S, Sharma A, Kumar S, Sharma SK, Gosh B (2006) Association of *TNF* haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *Am J Resp Cell Mol Biol* 35:488–495
 22. Delongui F, Grion CMC, Watanabe MAE, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM et al (2011) Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med* 2:349–356
 23. Amorini AM, Petzold A, Tavazzi B, Eikelenboom J, Keir G, Belli A et al (2009) Increased of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clin Biochem* 42:1001–1006
 24. Bjartmar C, Trapp BD (2001) Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Curr Opin Neurol* 14:271–278
 25. Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D (2004) The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *J Neurol* 251:261–268
 26. Pirko I, Lucchinetti CF, Sriram S, Bakshi R (2007) Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology* 68:634–642
 27. Morgen K, Sammer G, Courtney SM, Wolters T, Melchior H, Blecker CR et al (2006) Evidence for a direct association between cortical atrophy and cognitive impairment in relapsing-remitting MS. *NeuroImage* 30:891–898
 28. Patti F, De Stefano M, Lavorgna L, Messina S, Chisari CG, Ippolito D et al (2015) Lesion load may predict long-term cognitive dysfunction in multiple sclerosis patients. *PLOS One* 10:e0120754. doi:10.1371/journal.pone.0120754
 29. Tedeschi G, Lavorgna L, Russo P, Prinster A, Dinacci D, Savettieri G (2005) Brain atrophy and lesion load in a large population of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 65:280–285
 30. Kearney H, Rocca MA, Valsasina P, Balk L, Sastre-Garriga J, Reinhardt J et al (2014) Magnetic resonance imaging correlates of physical disability in relapse onset multiple sclerosis of long disease duration. *Mult Scler J* 20:72–80
 31. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840–846
 32. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revision to the McDonald Criteria. *Ann Neurol* 69:292–302. doi:10.1002/ana.22366
 33. 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.
 34. Suarez-Kurtz G, Pena SDJ, Struchiner CJ, Hutz MH (2012) Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Front Pharmacol* 3:191. doi:10.3389/fphar.2012.00191
 35. Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurol* 33:1444–1452
 36. 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
 37. Brazil. Ministry of Health. (2004) National Health Surveillance Agency Board: Resolution RDC no. 153, June 14, 2004. Official Gazette: 24 June, 2004, Brazil
 38. Teunissen CE, Petzold A, Bennett JL, Berven FS, Brundin L, Comabella M et al (2009) A consensus protocol for the standardization of cerebral fluid collection and biobanking. *Neurology* 73:1914–1922
 39. Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D et al (1999) Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 230:207–214
 40. Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B et al (2002) Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diag Lab Immunol* 9:1205–1211
 41. Gonzalez-Flecha BG, Llesuy S, Boveris A (1991) Hydroperoxydeinitiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsy heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med* 10:93–100
 42. Resnick AZ, Paccker L (1994) Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 233:257–263
 43. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S et al (1998) Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 16:2524–2532
 44. Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, de Rossi et al (2012) Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 133:89–97

45. Reppeto M, Reids 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
46. Kalincik T, Buzzard K, Jokubaitis V, Trojano M, Duquette P, Izquierdo G et al (2014) Risk of relapse phenotype recurrence in multiple sclerosis. *Mult Scler* 20:1511–1522. doi:10.1177/1352458514528762
47. Held U, Heigenhauser L, Shang C, Kappos L, Polman C, Sylvia Lawry Centre for MS Research (2005) Predictors of relapse rate in MS clinical trials. *Neurology* 65:1769–1773
48. Mowry EM, Deen S, Malikova I, Pelletier J, Bacchetti P, Waubant E (2009) The onset location of multiple sclerosis predicts the location of subsequent relapses. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:400–403. doi:10.1136/jnnp.2008.157305
49. Tremlett H, Yousefi M, Devonshire V, Rieckmann P, Zhao Y, Neurologists UBC (2009) Impact of multiple sclerosis relapses on progression diminishes with time. *Neurology* 73:1616–1623
50. Tremlett H, Zhao Y, Joseph J, Devonshire V, Clinic Neurologists UBCMS (2008) Relapses in multiple sclerosis are age- and time-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1368–1374
51. Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G et al (2013) Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain* 136:3609–3617. doi:10.1093/brain/awt281
52. Nguyen LT, Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Baier M, Brownschield C, Jacobs LD (2003) Sex differences in in vitro pro-inflammatory cytokine production from peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 209:93–99
53. Gardner AW, Parker DE, Montgomery PS, Sosnowska D, Casanegra AI, Ungvari Z et al (2015) Gender and racial differences in endothelial oxidative stress and inflammation in patients with symptomatic peripheral artery disease. *J Vasc Surg* 61:1249–1257. doi:10.1016/j.jvs.2014.02.045
54. Khadir A, Tiss A, Kavalakatt S, Behbehani K, Dehbi M, Elkum N (2015) Gender-specific association of oxidative stress and inflammation with cardiovascular risk factors in Arab population. *Mediators Inflamm* 2015:512603. doi:10.1155/2015/512603
55. Bove R, Chitnis T (2013) Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clinical Immunology* 149:201–210. doi:10.1016/j.clim.2013.03.005, PMID: 23608496
56. Cossburn M, Ingram G, Hirst C, Ben-Shlomo Y, Pickersgill TP, Robertson NP (2012) Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 18:45–54. doi:10.1177/1352458511417479, PMID: 21865412
57. Koch M, Uyttenboogaart M, Van Harten A, De Keyser J (2008) Factors associated with the risk of secondary progression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis* 14:799–803. doi:10.1177/1352458508089361, PMID: 18573840
58. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M et al (2010) The natural history of multiple sclerosis, a geographical based study 10: relapses and long-term disability. *Brain* 133:1914–1929. doi:10.1093/brain/awq118, PMID: 20534650
59. Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD (2003) Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:68–79
60. Takeuchi H, Wang J, Kawanokuchi J, Mitsuma N, Mizuno T, Suzumura A (2006) Interferon-gamma induces microglial-activation-induced cell death: a hypothetical mechanism of relapse and remission in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 22:33–39
61. Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 24:641–651. doi:10.1016/j.bbi.2010.01.014
62. Duddy ME, Armstrong MA, Crockard AD, Hawkins SA (1999) Changes in plasma, cytokines induced by interferon β 1a treatment in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 101:98–109
63. Trenova AG, Manova MG, Kostadinova II, Hrsitova DR, Vasileva TV, Zahariev ZI (2011) Clinical and laboratory study of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with multiple sclerosis. *Folia Med (Plovdiv)* 53:29–35
64. Graber JJ, Ford D, Zhan M, Francis G, Panitch H, Dhib-Jalbut S (2007) Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlation with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 185:168–174
65. Benvenuto R, Paroli M, Buttinelli C, Franco A, Bamaba V, Fieschi C et al (1991) Tumor necrosis factor-alpha synthesis by cerebrospinal-fluid-derived T cell clones from patients with multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 84:97–102
66. Leonard B, Maes M (2012) Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci Biobehav Rev* 36:764–785
67. Probert L (2015) TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience* 302:2–22. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.06.038
68. Montgomery SL, Bowers WJ (2012) Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 7:42–59
69. Brown GC, Vilalta A (2015) How microglia kill neurons. *Brain Res pii S0006-8993(15):00672-1*. doi:10.1016/j.brainres.2015.08.031
70. Olsson T (1995) Cytokine-producing cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurology* 45(Suppl 6):S11–S15
71. Sosa RA, Forsthuber TG (2011) The critical role of antigen-presentation-induced cytokine crosstalk in the central nervous system in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Interferon Cytokine Res* 31:753–768. doi:10.1089/jir.2011.0052
72. Dhib-Jalbut S, Arnold DL, Cleveland DW, Fisher M, Friedlander RM, Mouradian MM et al (2006) Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *J Neuroimmunol* 176:198–215
73. Hashioka S, McGeer EG, Miyaoka T, Wake R, Horiguchi J, McGeer PL (2015) Interferon- γ -induced neurotoxicity of human astrocytes. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 14:251–256
74. Imitola J, Chitnis T, Khoury SJ (2005) Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther* 106:163–177
75. Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424–435
76. Ireland SJ, Monson NL, Davis LS (2015) Seeking balance: potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL-6 and IL-10. *Cytokine* 73:236–244. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.009
77. Samoilova EB, Horton JL, Chen Y (1998) Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunol* 188:118–124
78. Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hume H et al (2003) Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 108:396–400
79. Maes M, Berk M, Goehler L, Song C, Anderson G, Gałecki P et al (2012) Depression and sickness behavior are Janus-faced responses to shared inflammatory pathways. *BMC Med* 10:66. doi:10.1186/1741-7015-10-66

80. Putheti P, Pettersson A, Soderstrom M, Link H, Huang YM (2004) Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol* 24:155–61
81. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199:971–979
82. Haas J, Hug A, Viehovec A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A et al (2005) Reduced suppressive effect of CD4+CD25 high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35:3343–3352
83. Feger U, Luther C, Poeschel S, Melms A, Tolosa E, Wiendl H (2007) Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol* 147:412–418
84. Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN, Morimoto HK, Lopes J, Panis C et al (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 321:49–53. doi:10.1016/j.jns.2012.07.045
85. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676–692
86. Andersen JK (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10(Suppl):S18–S25
87. Morris G, Walder K, Puri BK, Berk M, Maes M (2015) The deleterious effects of oxidative and nitrosative stress on palmitoylation, membrane lipid rafts and lipid-based cellular signalling: new drug targets in neuroimmune disorders. *Mol Neurobiol* [Epub ahead of print] PubMed
88. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11:81–128
89. Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V et al (2013) Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol* 2013:708659. doi:10.1155/2013/708659
90. Lull ME, Block ML (2010) Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7:354–365. doi:10.1016/j.nurt.2010.05.014
91. De Bustos F, Navarro JA, De Andres C, Molina JA, Jiménez-Jiménez FJ, Ortí-Pareja M et al (1999) Cerebrospinal fluid nitrate levels in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 41:44–47
92. Danilov AI, Andersson M, Bavand N, Wiklund NP, Olsson T, Brundin L (2003) Nitric oxide metabolite determinations reveal continuous inflammation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 136:112–118
93. Ferreti G, Bacchetti T, Principi F, Ludovico DL, Viti B, Angeleri VA et al (2005) Increased levels of lipid hydroperoxides in plasma of patients with multiple sclerosis: a relationship with paraoxonase activity. *Mult Scler* 11:677–682
94. Koch M, Mostert J, Arutjunyan AV, Stepanov M, Teelken A, Heersema D et al (2007) Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 14:529–33
95. Sayre LM, Perry G, Smith MA (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21:172–88
96. Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M (2011) The level of isoprostanes as a non-invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* 36:1012101–6
97. Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek I (2012) Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Biochem* 45:26–30
98. Bizzozero OA, De Jesus G, Callahan K, Pastuszyn A (2005) Elevated protein carbonylation in the brain white matter and gray matter of patients with multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81:687–695
99. Sheikh Z, Ahmad R, Sheikh N, Ali R (2007) Enhanced recognition of reactive oxygen species damage human serum albumin by circulating systemic lupus erythematosus autoantibodies. *Autoimmunity* 40:512–20
100. Moylan S, Berk M, Dean OM, Samuni Y, Williams LJ, O'Neil A et al (2014) Oxidative & nitrosative stress in depression: why so much stress? *Neurosci Biobehav Rev* 45:46–62
101. Dasgupta S, Jana M, Liu X, Pahan K (2002) Myelin basic protein-primed T cells induced nitric oxide synthase in microglial cells. Implications for multiple sclerosis. *J Biol Chem* 277:39327–39333
102. Brown GC, Neher JJ (2010) Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 41:242–247. doi:10.1007/s12035-010-8105-9
103. Boulemer AI, Petry KG, Meynard M, Geffard M (1995) Indirect evidence for nitric oxide involvement in multiple sclerosis by characterization of circulating antibodies directed against conjugated S-nitrosocysteine. *J Neuroimmunol* 60:117–124
104. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão AN, de Almeida ER, Morimoto HK, Alfieri DF et al (2014) Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 346:156–163. doi:10.1016/j.jns.2014.08.016
105. Brown MG, Kirby S, Skedgel C, Fisk JD, Murray TJ, Bhan V et al (2007) How effective are disease-modifying drugs in delaying progression in relapsing-onset MS? *Neurology* 69:1498–1507

Immune-Inflammatory and Oxidative and Nitrosative Stress Biomarkers of Depression Symptoms in Subjects with Multiple Sclerosis: Increased Peripheral Inflammation but Less Acute Neuroinflammation

Ana Paula Kallaur¹ · Josiane Lopes¹ · Sayonara Rangel Oliveira² ·
Andrea Name Colado Simão² · Edna Maria Vissoci Reiche² ·
Elaine Regina Delicato de Almeida² · Helena Kaminami Morimoto² ·
Wildea Lice Carvalho Jennings de Pereira² · Daniele Frizon Alfieri² ·
Sueli Donizete Borelli³ · Domacio Ramon Kaimen-Maciel^{4,5} · Michael Maes^{1,6,7}

Received: 10 June 2015 / Accepted: 11 September 2015 / Published online: 24 September 2015
© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract There is evidence that activated immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways play a role in the pathophysiology of multiple sclerosis (MS) and depression. This study examines serum levels of interleukin (IL)-1 β , IL-4, IL-6, and IL-10; peroxides (LOOH); nitric oxide metabolites (NOx); albumin; ferritin; C-reactive protein (CRP); and *tumor necrosis factor (TNF)- β NcoI* polymorphism (rs909253) and gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) scan in MS patients with ($n=42$) and without ($n=108$) depression and normal controls ($n=249$). Depression is scored using the depressive subscale of the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS). The extent of neurological disability is measured using the Expanded Disability Status Scale (EDSS) at the same time of the abovementioned measurements and 5 years earlier. Disease progression is assessed as actual EDSS—EDSS 5 years earlier. Three variables discriminate MS patients with depression from those without depression, i.e., increased IL-6 and lower IL-4 and albumin. Binary logistic regression showed

that MS with depression (versus no depression) was characterized by more gastrointestinal symptoms and disease progression, higher serum IL-6, and lower albumin levels. In subjects with MS, the HADS score was significantly predicted by three EDSS symptoms, i.e., pyramidal, gastrointestinal, and visual symptoms. Fifty-eight percent of the variance in the HADS score was predicted by gastrointestinal symptoms, visual symptoms, the *TNFB1/B2* genotype, and contrast enhancement (both inversely associated). There were no significant associations between depression in MS and type of MS, duration of illness, age, sex, nicotine dependence, and body mass index. MS with depression is associated with signs of peripheral inflammation, more disability, disease progression, gastrointestinal and visual symptoms, but less contrast enhancement as compared to MS without depression. It is concluded that depression is part of the neurological symptoms of MS and that its expression is primed by peripheral inflammation while acute neuroinflammation and the *TNFB1/B2* genotype may be protective.

✉ Michael Maes
dr.michaelmaes@hotmail.com; <http://scholar.google.co.th/citations?user=1wzMZ7UAAAAJ&hl=th&oi=ao&cstart=100&pagesize=100>

¹ Health Sciences Postgraduate Program, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

² Department of Pathology, Clinical Analysis, and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

³ Department of Clinical Analysis, Laboratory of Immunogenetics, State University of Maringá, Maringá, Paraná, Brazil

⁴ Outpatient Clinic for Multiple Sclerosis, University Hospital, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁵ Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

⁶ Department of Psychiatry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

⁷ IMPACT Strategic Research Center, School of Medicine, Deakin University, PO Box 281, Geelong 3220, Australia

Keywords Depression · Multiple sclerosis · Cytokines · Oxidative and nitrosative stress · Inflammation · Immune · Autoimmune

Introduction

There is copious evidence that activated immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress (IO&NS) pathways play a role in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) [1–3]. Increased levels of IO&NS biomarkers are observed in the brain, cerebrospinal fluid (CSF), and blood of MS patients [4, 5]. For example, increased levels of the proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), are observed in the plasma or CSF of patients with MS [6–11]. Increased concentrations of inflammatory mediators such as plasma TNF- α are often associated with the degree of disability as measured with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [12] and predict disease activity [13, 14]. Th1-like cytokines, such as IL-2, IL-12, and interferon (IFN)- γ , are often increased in active disease states [8–11], whereas Th2-like cytokines, including IL-4 and IL-10, may be increased during remission [15–18]. Nevertheless, concomitant increases in the expression of Th1- and Th2-like cytokines may be present during an acute attack [5, 19]. Recently, we observed that *TNF- β NcoI* polymorphism is significantly associated with MS, i.e., the *TNFB2/B2* genotype is associated with MS and with increased TNF- α levels [20].

The levels of oxidative stress biomarkers significantly increase during relapses but decrease during remission [21]. Oxidative stress levels in the plasma and CSF of MS patients are positively associated with the EDSS score [13, 14]. Increased inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS), NO production, and its metabolites nitrate and nitrite (NOx) are detected in the lesions, brain, and CSF of MS patients [22]. Increased NOx levels in the CSF, but not plasma, are correlated with disease progression [22]. Moreover, increased levels of oxidative stress are associated with the degree of gadolinium-enhanced brain lesions in magnetic resonance imaging (MRI) scan, an index of acute neuroinflammation and increased blood-brain barrier (BBB) hyperpermeability [14].

Clinical depression is the most common psychiatric manifestation of MS affecting more than 50 % of the patients [23, 24]. In MS, depression may precede the onset of neurological symptoms and is associated with a lowered quality of life and increased morbidity and mortality [24–26]. To complicate matters, treatment of MS with IFN- β may cause or exacerbate depression and a switch to treatment with glatiramer acetate is indicated when depression becomes an issue [27, 28]. The depression subscale of the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) is a validated rating scale to measure depression in nonpsychiatric outpatients [29, 30].

Recently, we have reviewed that shared IO&NS pathways may underpin the comorbidity between MS and depression, including increased levels of monocytic and Th1-like cytokines, and increased reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and increased expression of iNOS [31]. During acute MS attacks, mRNA expression of TNF- α and IFN- γ is significantly correlated with severity of depression [32]. IFN- γ production by Th1 lymphocytes is significantly and positively correlated with depression in MS patients [33]. The initially increased production of IFN- γ by autoaggressive T cells in MS, which is associated with depression, is reduced during treatment with antidepressant drugs or psychotherapy [34].

The aims of the present study are to examine the differences in cytokine profile (IL-1 β , IL-4, IL-6, and IL-10), inflammatory markers (ferritin, albumin, and C-reactive protein (CRP)), IO&NS markers (peroxides and NOx), *TNF- β NcoI* polymorphism, and neuroinflammation (as measured with the gadolinium-enhanced MRI scan) in MS patients with and without depression and to examine the relationships between depression severity and IO&NS biomarkers, the extent of disability, and neurological symptoms.

Subjects and Methods

Subjects

We included 150 MS patients who consecutively attended the Neurology Outpatient Department of the Outpatient Clinical Hospital, State University of Londrina, Londrina, Brazil. The diagnosis of MS was made using the revised McDonald criteria [35, 36]. Patients were classified into relapsing-remitting MS (RRMS), secondary progressive MS (SPMS), primary progressive MS (PPMS), and clinically isolated syndrome (CIS) [37]. All RRMS patients were in the remitting phase of illness, i.e., a period of recovery with no relapse episodes within the last 3 months prior to the time of enrollment in the study. Patients with neuromyelitis optica were excluded from this study.

We also included 249 healthy volunteers, i.e., healthy blood donors recruited at the Blood Bank of Londrina, Londrina, Brazil. We excluded controls with autoimmune disorders, blood-borne transmitted infection, and clinical symptoms of recent infections or inflammation. Written informed consent was obtained from all of patients and controls. The study protocol was approved by the Institutional Research Ethic Committee of the State University of Londrina, Londrina, Brazil.

Methods

A standard questionnaire and medical records were used to assess sociodemographic and clinical data. Self-reported ethnicity was registered as Caucasian, Asian, Black, or Mixed. Age at

onset of MS and duration of illness were assessed based on data from medical records [35]. The degree of disability of the patients was evaluated employing the EDSS [12], which scores severity of disability as mild (EDSS between 0.0 and 4.0), moderate (EDSS between 4.5 and 5.5), or severe (EDSS between 6.0 and 10.0). We also scored neurological symptoms as pyramidal (P), cerebellar (CII), brain stem (BS), sensory (S), bladder (Bb), gastrointestinal (Bi), visual (V), cerebral (Cb), and other (O) [12] symptoms. We measured the EDSS and the neurological symptoms prospectively in a subgroup of patients in 2006 and again in 2011. Disease progression was evaluated by computing the Δ EDSS, that is EDSS in 2011–EDSS in 2006. Severity of depression was assessed in 2011 using the depression subscale of the HADS [29]. In patients with MS, a cutoff score >8 on the HADS depression subscale can be used as a diagnostic criterion for major depression with a sensitivity of 90 % and a specificity of 87.3 % [38]. Consequently, we divided patients with MS into these with and without depression using the >8 threshold value.

The diagnosis of nicotine dependence was made using the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Text Revision (DSM IV-TR). We also registered the use of medication, i.e., glucocorticoids, antidepressants (i.e., fluoxetine, nortryptiline, setraline, or amitryptiline), and disease-modifying drugs (DMDs) that slow down progression and attenuate flare-ups, i.e., IFN- β 1a, natalizumab, or glatiramer acetate. We measured body weight using an electronic scale in individuals wearing light clothing, but no shoes, and height using a stadiometer. Consequently, body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (in meter) squared.

In 2011, MRI scans were performed in the brain, cervical, and spinal cord (T1, T2, and flair sequences) to detect lesion location and the presence of gadolinium contrast-enhancing lesions. Also, in 2011, blood samples were collected (with and without EDTA as anticoagulant), centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and stored at -80°C until thawed for assay of cytokines, albumin, ferritin, LOOH, and NOx. Samples were consecutively identified by number to guarantee the confidentiality. Serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β and IL-6) and Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) were assayed using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, eBioscience, San Diego, CA, USA). The limits of detection were as follows: IL-1 β 2.0 ng/mL, IL-6 1.0 ng/mL, IL-4 1.0 ng/mL, and IL-10 1.0 ng/mL. Albumin assays were performed using a biochemical autoanalyzer (DimensionTM Dade AR Dade Behring, Deerfield, IL, USA). Ferritin levels were determined by chemiluminescence microparticle immunoassay (ArchitechTM, Abbott Laboratory, Abbott Park, IL, USA). High sensitivity C-reactive protein (hsCRP) was determined using nephelometry (NephelometerIITM, DadeBehring-Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, IL, USA) with an analytical sensitivity of 0.175 mg/L.

The stable NO metabolites, nitrate and nitrite (NOx), are used as an index of NO production and as a marker of NOS enzyme activity. NOx levels are assessed by determining plasma nitrite concentrations using an adaptation of the technique described by Navarro-González et al. [39]. The quantification of NOx is made in a microplate reader Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, USA). Plasma levels of CL-LOOH were evaluated as described previously [40], and the results were expressed in counts per minute (cpm). TRAP was determined as reported by Reppeto et al. [41]. The system was calibrated with the vitamin E analog TROLOX, and the values of TRAP are expressed in equivalent of :M Trolox/mg uric acid.

Genomic DNA was extracted from the buffy coat using the reagent resin column (Biopur, Biometrix Diagnóstica, Curitiba, Brazil) according to the manufacturer's instructions. A 782-base-pair (bp) fragment of the *TNF- β* gene was amplified using polymerase chain reaction (PCR) as previously reported [42–44]. PCR was performed in a thermocycler (Applied Biosystems VeritiTM 96-Well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA). The PCR product was digested using *Nco*I restriction enzyme (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and the genotypes were identified by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) with electrophoresis on 3 % agarose gel (70 V, 70 min) after staining with ethidium bromide. The *TNFB1* allele includes a restriction site for *Nco*I, which results in 196- and 586-bp fragments after digestion, and the *TNFB2* allele (lacking the restriction site for *Nco*I) results a fragment with 782 bp. The heterozygous genotype *TNFB1/B2* results in three fragments (782, 586, and 196 bp). The PCR-RFLP profiles were captured and recorded by the photo documentation system L-PIX-HE (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brazil).

Statistics

We used analyses of contingency tables (χ^2 test) or Fisher's exact probability test to assess associations between diagnostic categories and clinical and sociodemographic data. Analyses of variance (ANOVAs) followed by Bonferroni-adjusted least significant difference to examine multiple comparisons among group means (only used when the overall ANOVA was significant) were employed to examine differences in clinical, sociodemographic, and IO&NS biomarker data between the diagnostic groups. Automatic stepwise multinomial logistic regression analyses with MS with and without depression and controls as dependent variables and clinical and IO&NS markers as explanatory variables were employed to delineate the significant explanatory variables that are associated with the diagnostic groups. Automatic binary logistic regression analyses with MS with depression as the dependent variable (and MS without depression as the reference group) were used to assess the significant clinical and IO&NS markers that predict the diagnostic groups. Multivariate general linear model

(GLM) analyses (followed by analyses of between-subject tests or univariate GLM analyses) were performed to delineate the relationships between clinical data (the EDSS, neurological symptoms, HADS, and disease progression) as dependent variables, and age, gender, nicotine dependence, medications, BMI, etc. as explanatory variables. Automatic linear (multiple) regression analyses with the HADS score as the dependent variable and the clinical variables and IO&NS biomarker data as explanatory variables were performed to delineate the significant predictors of severity of depression in patients with MS. Factor analysis, the principal component method, was used to interpret the associations between the HADS score and neurological symptoms using a quartimax rotation of the subtracted principal components. The Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit test was used to assess normality of distribution. Logarithmic (Ln) transformations of continuous data were used in the analyses when the variables were not normally distributed or when there was heterogeneity of variance (as assessed with the Levene test). We used the SPSS (Windows version 22), Statistica, and MaesStat to perform statistical analyses. All analyses were performed at $p=0.05$ (two-tailed).

Results

Demographic Data and Biomarkers

Table 1 shows that there were no significant differences in age, ethnicity, or BMI between controls and MS patients with or without depression. Using univariate analyses, there were no significant differences in hsCRP, IL-1, IL-6, and IL-10 between these three groups. IL-4 levels were significantly higher in patients with MS without depression versus controls. Ferritin and LOOH levels were significantly higher in MS patients than in controls. Albumin was significantly lower in patients with MS and depression than in controls. NOx levels were significantly lower in patients with MS with or without depression versus controls. TRAP levels were significantly lower in patients with MS without depression than in controls. The frequency of *TNFB2/B2* genotype was greater in MS patients without depression.

Effects of Possible Intervening Factors on the Biomarkers

In order to delineate the possible effects of intervening variables, including sex, age, nicotine dependence, ethnicity, and use of DMDs and antidepressants, we have carried out four different multivariate GLM analyses with the grouped biomarkers or clinical data as dependent variables. Multivariate GLM analysis with IL-1, IL-4, IL-6, and IL-10 as dependent variables showed that sex ($F=1.23$, $df=4/124$, $p=0.301$), age ($F=1.51$, $df=4/124$,

$p=0.204$), nicotine dependence ($F=1.61$, $df=4/124$, $p=0.175$), ethnicity ($F=1.94$, $df=4/124$, $p=0.108$), DMDs (that is no drugs, IFN- β , or glatiramer; $F=1.20$, $df=4/124$, $p=0.315$), and antidepressants ($F=1.35$, $df=4/143$, $p=0.254$) were all not significant. Multivariate GLM analysis with LOOH, NO, and TRAP as dependent variables showed that sex was marginally significant ($F=3.85$, $df=3/101$, $p=0.012$) and that age ($F=1.51$, $df=3/101$, $p=0.217$), nicotine dependence ($F=1.26$, $df=3/101$, $p=0.293$), ethnicity ($F=0.39$, $df=3/101$, $p=0.764$), DMDs ($F=1.41$, $df=3/101$, $p=0.244$), and antidepressants ($F=0.33$, $df=3/109$, $p=0.809$) were not significant. Multivariate GLM analysis with ferritin, albumin, and hsCRP as dependent variables showed that sex had a significant effect ($F=15.56$, $df=3/136$, $p<0.001$; ferritin and albumin being higher in men), but that the other factors were not significant, that is age ($F=1.25$, $df=3/136$, $p=0.294$), nicotine dependence ($F=1.53$, $df=3/136$, $p=0.210$), ethnicity ($F=0.29$, $df=3/136$, $p=0.833$), DMDs ($F=2.01$, $df=3/136$, $p=0.115$), and antidepressants ($F=1.72$, $df=3/156$, $p=0.164$).

Multivariate GLM analysis with the EDSS score, Δ EDSS, and all neurological symptoms as dependent variables showed a significant effect of age (age being significantly and positively associated with all variables, except BS, Cb, and O symptoms and the Δ EDSS), while the other variables (including DMDs, antidepressants, and glucocorticoids) were not significant. We have also examined the effects of DMDs, coded as no use versus use of IFN- β , glatiramer, or natalizumab, on the EDSS variables and symptoms ($F=0.88$, $df=11/121$, $p=0.562$); the four cytokines ($F=1.73$, $df=4/142$, $p=0.146$); ferritin, albumin, and hsCRP ($F=1.37$, $df=3/154$, $p=0.253$); and LOOH, NOx, and TRAP ($F=1.13$, $df=3/108$, $p=0.339$) and could not find any effects. Multivariate GLM analyses showed that the use of glucocorticoids had no significant effect on the EDSS and symptoms ($F=0.81$, $df=11/120$, $p=0.999$); the four cytokines ($F=0.81$, $df=4/313$, $p=0.522$); ferritin, hsCRP, and albumin ($F=0.93$, $df=3/340$, $p=0.426$), but was significantly associated with LOOH, NOx, and TRAP ($F=3.32$, $df=3/260$, $p=0.020$). Analyses of between-subject tests showed that glucocorticoids significantly suppressed NOx ($F=4.19$, $df=1/262$, $p=0.018$) and TRAP ($F=5.16$, $df=1/262$, $p=0.024$). Positive contrast enhancement on the gadolinium-enhanced MRI scan was not significantly associated with DMDs ($\chi^2=1.32$, $df=2$, $p=0.518$) and the use of antidepressants (Fisher's exact test: $p=0.255$), but was positively associated with glucocorticoid use ($\chi^2=6.15$, $df=1$, $p=0.013$; odds ratio=3.00, lower and upper 95 % confidence of interval levels 1.22–7.36).

Using the HADS score as dependent variable and DMDs ($F=3.20$, $df=1/139$, $p=0.076$), glucocorticoids ($F=0.01$, $df=1/139$, $p=0.908$), and antidepressants ($F=0.29$, $df=1/139$, $p=0.112$) or any of their two-way interactions as explanatory variables did not show any effects of these drugs ($F=1.76$, $df=6/$

Table 1 Sociodemographic and biomarker data in normal controls (NC) and multiple sclerosis (MS) patients with (+MDD) and without (–MDD) an increased Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) score

Variables	NC (n=249)	MS–MDD (n=108)	MS+MDD (n=42)	F or χ^2 ^a	df	p
Age (years)	36.7 (10.9)	40.1 (13.5)	44.8 (14.4)	9.16	2/396	0.001
Gender (female/male)	177/72	76/32	35/7	2.93	1	0.231
Non-Caucasian/Caucasian	50/199	18/90	10/31	1.22	2	0.542
BMI (kg/m ²)	25.1 (4.4)	25.2 (5.1)	25.4 (4.7)	0.07	2/320	0.929
IL-1 (ng/mL) ^b	9.2 (29.3)	5.0 (6.8)	4.0 (4.2)	1.38	2/307	0.252
IL-4 (ng/mL) ^b	1.4 (1.5)	4.6 (7.1)	3.2 (5.6)	15.44	2/310	<0.001
IL-6 (ng/mL) ^b	5.3 (14.7)	4.2 (6.3)	10.7 (32.7)	1.37	2/306	0.256
IL-10 (ng/mL) ^b	6.8 (8.8)	5.1 (3.3)	5.9 (3.2)	1.33	2/306	0.266
LOOH (mmol/L) ^b	16,770 (15,787)	24,675 (12,560)	24,092 (11,039)	27.65	2/279	<0.001
NOx (:mL) ^b	46.0 (26.0)	19.7 (24.7)	26.3 (25.8)	73.55	2/247	<0.001
TRAP (:m Trolox) ^b	721.1 (144.6)	657.5 (141.0)	693.8 (106.6)	5.52	2/280	0.004
CRP (mg/L) ^b	2.95 (4.72)	2.53 (3.54)	3.24 (4.31)	1.21	2/360	0.300
Ferritin	94.6 (90.1)	214.9 (250.7)	213.8 (269.6)	19.02	2/336	<0.001
Albumin (mg/dL)	4.15 (0.31)	4.06 (0.40)	4.00 (0.41)	3.96	2/332	0.020
<i>TNFB1B2</i> genotype N/Y	0.51	0.43	0.55	3.09	2	0.245
<i>TNFB2B2</i> genotype N/Y	0.39	0.49	0.35	3.06	2	0.216

Results are shown as mean (\pm SD); or as frequencies

^a All the results of analyses of variance (*F* values) or contingency analyses (O^2 tests)

^b These variables are processed in Ln transformation

139, $p=0.112$). Bivariate logistic regression analysis showed that the use of DMDs, glucocorticoids, and antidepressants was not significantly associated with MS with depression ($\chi^2=6.68$, $df=4$, $p=0.154$, Nagelkerke=0.065). In this analysis, the use of antidepressants (Wald=5.72, $df=1$, $p=0.017$), but not DMDs (Wald=0.89, $df=2$, $p=0.640$) or glucocorticoids (Wald=0.09, $df=1$, $p=0.922$), was positively associated with depression.

Immune-Inflammatory Biomarkers, MS, and Depression

Table 2 shows the results of automatic multinomial logistic regression analyses with MS with and without depression and the control group as the dependent variable and the IO&NS biomarkers as explanatory variables. We found that six variables were significant in explaining the diagnostic groups ($\chi^2=161.40$, $df=12$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.642; correctly classified subjects=82.9 %), i.e., IL-6 ($\chi^2=11.00$, $df=2$, $p=0.004$), IL-4 ($\chi^2=20.00$, $df=2$, $p<0.001$), LOOH ($\chi^2=21.03$, $df=2$, $p<0.001$), NOx ($\chi^2=53.19$, $df=2$, $p<0.001$), ferritin ($\chi^2=16.95$, $df=2$, $p<0.001$), and albumin ($\chi^2=7.24$, $df=2$, $p=0.027$). Increased IL-4, LOOH, and ferritin but lower NOx were associated with MS without depression versus controls. MS with depression was characterized by increased IL-6, LOOH, and ferritin and lowered albumin and NOx as compared to controls. Three explanatory variables discriminated MS patients with

depression from those without depression, i.e., increased IL-6 and lowered IL-4 and albumin. Forced entry showed that nicotine dependence was not a significant explanatory variable ($\chi^2=4.45$, $df=2$, $p=0.349$) and that IL-6 (Wald=5.02, $df=1$, $p=0.025$), IL-4 (Wald=5.74, $df=1$, $p=0.017$), and albumin (Wald=5.16, $df=1$, $p=0.023$) remained significant as explanatory variables separating MS with and without depression. Forced entry of DMDs (Wald=0.00, $df=1$, $p=0.997$) and the use of antidepressants (Wald=1.22, $df=1$, $p=0.269$) showed that these variables were not significant in discriminating MS with and without depression and that IL-6, IL-4, and albumin remained significant as explanatory variables. Forced entry of age, sex, and BMI showed that these variables were not significant.

Characteristics of MS with Depression

Table 3 shows the differences between individuals with and without depression. There were no significant differences between both groups with respect to positive gadolinium enhancement on MRI scan, the use of DMDs and glucocorticoids, and type of MS. Only two patients were treated with natalizumab, and therefore, we could not run separate analyses on this drug. The use of antidepressant drugs was higher in MS patients with depression than in those without depression. Patients with depression showed significantly higher scores on the total EDSS

Table 2 Results of multinomial logistic regression analysis with normal controls (NC) and patients with multiple sclerosis with (MS+MDD) and without (MS–MDD) depression as dependent variables and

immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers as explanatory variables

Contrasts	Explanatory variables	Wald	df	p	Odds ratio	95 % CI (lower–upper)
MS–MDD versus NC	IL-4	14.30	1	<0.001	3.57	1.85–6.90
	LOOH	12.87	1	<0.001	5.57	2.18–14.24
	NOx	31.54	1	<0.001	0.11	0.05–0.24
	Ferritin	9.41	1	0.002	1.01	1.00–1.01
MS+MDD versus NC	Albumin	4.63	1	0.031	0.17	0.03–10.84
	IL-6	6.40	1	0.011	2.01	1.17–3.46
	LOOH	13.10	1	<0.001	7.75	2.56–23.48
	NOx	18.07	1	<0.001	0.17	0.07–0.38
	Ferritin	10.23	1	<0.001	1.01	1.00–1.01
MS+MDD versus MS–MDD	Albumin	6.17	1	0.013	0.14	0.03–0.66
	IL-6	9.01	1	0.003	2.43	1.36–4.35
	IL-4	4.05	1	0.044	0.53	0.28–0.98

score (in 2011 but not in 2006), Δ EDSS, and P, S, Bb, Bi, V, Cb, and O symptoms in 2001 and Bi symptoms in 2006.

In order to delineate the best prediction of MS with versus depression, we performed a binary logistic regression analysis with MS and depression as the dependent variable and MS without depression as the reference group. Table 4 shows the results of three different automatic regression analyses: the first one used the EDSS 2011 data only and showed that Bi symptoms and Δ EDSS were significantly associated with MS with depression ($\chi^2=25.46$, $df=2$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.325). The second regression analysis was performed using all EDSS symptoms in 2006 and 2011 and showed that Bi symptoms in 2011 and V symptoms in 2006 were the most significant predictors of depression ($\chi^2=14.68$, $df=2$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.395).

The third binary logistic regression analysis was performed on the same clinical variables as shown in the first regression together with the IO&NS biomarkers. We found that four explanatory variables were significantly associated with depression, i.e., IL-6, Bi in 2011, and Δ EDSS (all positively) and albumin (negatively) ($\chi^2=34.15$, $df=4$, $p<0.001$; Nagelkerke=0.572; 84.4 % of all cases were correctly classified with a sensitivity of 61.1 % and a specificity of 92.2 %).

Prediction of the HADS Score

Pearson correlation calculation showed that the HADS was significantly correlated with age ($r=0.229$, $p=0.005$, $n=150$), EDSS 2011 ($r=0.365$, $p<0.001$, $n=146$), and P ($r=0.390$, $p<0.001$, $n=109$), S ($r=0.338$, $p<0.001$, $n=109$), Bb ($r=0.236$, $p=0.013$, $n=109$), Bi ($r=0.410$, $p<0.001$, $n=109$), V ($r=0.242$, $p=0.011$, $n=109$), and C ($r=0.252$, $p=0.008$, $n=109$) symptoms in 2011, but not with duration of illness, BMI, or any of the IO&NS biomarkers.

Table 5 shows the outcome of two different automatic GLM analysis with the HADS score as the dependent variable and the EDSS and neurological symptoms in 2011 (regression 1) or these clinical variables and IO&NS biomarkers (regression 2) as explanatory variables. We found that the HADS score was significantly predicted by P, Bi, and V symptoms in 2011. Regression 2 shows that Bi and V in 2011 and V in 2011 were positively associated with the HADS, while the *TNFB1/B2* genotype and a positive gadolinium-enhanced MRI scan were inversely associated with the HADS score. Forced entry of the use of glucocorticoids ($F=0.27$, $df=1/40$, $p=0.608$), DMDs ($F=0.82$, $df=2/39$, $p=0.449$), and antidepressants ($F=0.72$, $df=1/40$, $p=0.400$) was not significant and did not change the abovementioned associations.

Results of Factor Analysis

Table 6 shows the results of a factor analysis with all neurological symptoms in 2011 and the HADS as variables. We found that without rotation, the HADS and the EDSS symptoms, except BS, were significantly loaded on the first PC explaining 27.5 % of the variance. Quartimax rotation showed that the HADS loaded together with P, S, Bb, Bi, V, and Cb symptoms on PC1. PC2 loaded highly on P, CII, and O, and PC3 loaded highly on BS, Bb, and V but negatively on Cb symptoms.

Discussion

The first major finding of this study is that depression in MS is accompanied by specific immune-inflammatory biomarkers. Thus, we found increased serum IL-6 but lower serum IL-4 and albumin levels in MS patients with depression as

Table 3 Clinical and biomarker data in patients with multiple sclerosis with (MS+MDD) and without (MS–MDD) depression, divided according to a cutoff score >8 on the Hospital Anxiety and Depression Scale

Variables	MS–MDD	MS+MDD	F/χ^2 ^a	<i>df</i>	<i>p</i>
HADS	3.1 (2.4)	10.1 (1.8)	292.13	1/148	<0.001
EDSS in 2006	1.15 (1.68)	1.31 (1.41)	0.62	1/148	0.593
EDSS in 2011	2.40 (2.00)	3.62 (1.32)	14.28	1/144	<0.001
ΔEDSS	1.26 (1.47)	2.36 (1.65)	15.49	1/144	<0.001
Pyramidal functions 2006	1.86 (1.26)	1.64 (0.85)	0.57	1/76	0.451
Pyramidal functions 2011	1.91 (1.49)	3.25 (1.32)	19.60	1/108	<0.001
Cerebellar functions 2006	0.38 (0.78)	0.59 (1.09)	0.96	1/76	0.331
Cerebellar functions 2011	0.92 (1.34)	1.25 (1.34)	1.41	1/108	0.237
Brain stem functions 2006	0.23 (0.54)	0.14 (0.47)	0.54	1/76	0.467
Brain stem functions 2011	0.09 (0.37)	0.06 (0.35)	0.13	1/108	0.722
Sensory functions 2006	0.48 (0.74)	0.23 (0.53)	2.17	1/76	0.144
Sensory functions 2011	0.73 (1.11)	1.34 (1.07)	7.05	1/108	0.009
Bladder functions 2006	0.32 (0.81)	0.73 (1.49)	2.39	1/76	0.126
Bladder functions 2011	0.85 (1.41)	1.59 (1.85)	5.31	1/108	0.023
Bowel functions 2006	1.02 (0.65)	1.41 (0.80)	5.06	1/76	0.027
Bowel functions 2011	1.04 (0.47)	1.97 (1.43)	26.56	1/108	<0.001
Visual functions 2006	0.51 (0.99)	0.68 (1.43)	0.36	1/76	0.558
Visual functions 2011	0.21 (0.59)	0.50 (0.92)	4.04	1/108	0.047
Cortical functions 2006	1.04 (0.66)	1.09 (0.43)	0.13	1/76	0.718
Cortical functions 2011	0.99 (0.25)	1.16 (0.45)	6.25	1/108	0.014
Other functions 2006	0.95 (0.30)	1.05 (0.21)	2.03	1/76	0.158
Other functions 2011	1.14 (0.53)	1.44 (0.50)	7.35	1/108	0.008
RR versus other (N/Y)	26/82	12/31	0.24	1	0.624
Gadolinium-enhanced MRI (N/Y)	75/24	28/7	0.26	1	0.610
No DMDs	17	7	1.19	2	0.551
IFN-γ	78	26			
Glatiramer	12	7			
No DMDs	17	7	0.06	1	0.814
Use of DMDs	90	33			
Glucocorticoids (N/Y)	94/14	38/5	0.05	1	0.823
Antidepressants (N/Y)	98/10	32/10	4.35	1	0.037

Results are shown as mean (± SD)

EDSS Expanded Disability Status Scale, RR relapsing-remitting versus the other MS subtypes, DMDs the disease-modifying drugs, IFN-γ or glatiramer

^a All the results of analyses of variance (*F* values) or contingency analyses (χ^2 tests)

compared to those without depression. Increased IL-6 and lowered albumin are well-established inflammatory markers of depression [45–48]. Our data that IL-6 levels are increased

in patients with MS and depression extend those of Koutsouraki et al. [49] showing that increased serum IL-6 levels were found in acute phase MS patients with depression

Table 4 Results of binary logistic regression analysis with multiple sclerosis with an increased HADS score (MS+MDD) as the dependent variable and MS patients with a HADS score <8 as the reference group

Significant explanatory variables	Wald	df	p	Odds ratio	95 % CI (lower–upper)
Bowel functions 2011	11.37	1	0.001	3.48	1.69–7.18
Δ EDSS	8.64	1	0.003	1.64	1.18–2.28
Visual functions 2006	5.38	1	0.020	2.55	1.16–5.64
Bowel functions 2011	8.84	1	0.003	4.70	1.69–13.06
IL-6	6.57	1	0.010	2.91	1.29–6.59
Albumin	4.18	1	0.041	0.11	0.01–0.91
Bowel functions 2011	10.17	1	0.001	9.64	2.40–38.82
Δ EDSS	8.20	1	0.004	2.53	1.34–4.78

versus those without depression. Thus, not only depression in the remission phase (our study) but also depression in the acute state of MS is accompanied by increased IL-6 levels. The lowered IL-4 levels in our MS patients with depression may indicate a lowered negative immunoregulatory potential and thus an elevated capacity to immune-inflammatory responses. As such, depression in patients with MS is related to an increased peripheral immune-inflammatory potential.

There were, however, no significant differences between the O&NS biomarkers in MS patients with and without depression. Thus, LOOH and NOx were significantly higher and TRAP was significantly lower in MS with and without depression than in controls. In addition, we were unable to detect any significant correlations between the HADS score and the O&NS biomarkers. Major depression, on the other hand, is accompanied by increased levels of O&NS biomarkers and lowered antioxidant levels [31].

We also observed that the severity of depression in MS is inversely associated with the *TNFB1/B2* genotype, while the *TNFB2* allele was associated with MS per se [20]. Thus, it may be that the *TNF- β NcoI* polymorphism is differently associated with MS per se versus depression during MS. The *TNFB2/B2* genotype is associated with increased TNF- α and decreased IL-4 and IL-10 levels, suggesting that this genotype is accompanied by increased inflammatory potential as compared to the other genotypes [20]. This may explain our findings that the *TNFB1/B2* genotype which shows lowered inflammatory potential (i.e., less TNF- α but increased IL-4 and IL-10) is protective against depression.

One limitation of this study is that we measured IL-6 but not the soluble IL-6 receptor (sIL-6R) levels and sgp130 levels. Classical IL-6 signaling proceeds when IL-6 binds to the IL-6R (or CD126) on leukocyte subsets, hepatocytes, megakaryocytes, and some neuronal cells and forms a complex with gp130 activating the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) and the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways [50, 51]. However, many other cells, including some neuronal cells, without

IL-6R expression can mount IL-6 signaling when serum IL-6 first binds to serum sIL-6Rs thereby forming a sIL-6R/IL-6 complex, which may drive IL-6 trans-signaling in cells expressing membrane gp130 [50, 51]. Interestingly, IL-6 has dual, Janus face-like effects: while classical IL-6 signaling has homeostatic effects, including neurotrophic, regenerative, and anti-inflammatory effects, IL-6 trans-signaling causes detrimental proinflammatory effects [50, 51]. Major depression and bipolar disorder are characterized by increased levels of serum IL-6 and sIL-6R levels without significant changes in sgp130 levels, suggesting that depression is accompanied by classical IL-6 and IL-6 trans-signaling [51]. Thus, our results do not allow to conclude whether the increased IL-6 levels in MS with depression indicate increased anti-inflammatory or proinflammatory effects. Interestingly, Koutsouraki et al. [49] found that serum IL-6 and sIL-6R levels were significantly higher in acute phase MS patients with depression than in the remission group.

The second major finding of this study is that severity of depression was inversely associated with contrast enhancement on the gadolinium MRI scan. In other studies, depression was associated with T1 lesions but not with bright T2 lesions or enhancement [52]. At first sight, our results may appear to contradict the findings of a greater peripheral immune-inflammatory response in MS subjects with depression. Indeed, contrast enhancement on gadolinium MRI scan is associated with increased BBB permeability and acute perivascular inflammation [53]. The gadolinium MRI scan enhancing active lesions differentiates between active versus chronic lesions [54, 55]. Thus, our results may indicate that the acute injury of BBB disruption and thus acute inflammation is associated with attenuated depressive symptoms. The acute inflammatory state is followed by a subacute and a late phase characterized by resorption of inflammatory edema, degeneration, and repair including remyelination [55–57]. Although this progressive state is generally not accompanied by gadolinium enhancement, inflammation and tissue injury may occur even in the absence of BBB breakdown [55]. Pathological studies show that in the chronic active or smoldering

Table 5 Results of two different automatic GLM analysis with the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) score as the dependent variable and the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and neurological symptoms (regression 1) or the combination of neurological symptoms and immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers (regression 2) as explanatory variables

Variables	<i>B</i>	SE	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	Partial eta squared
Model regression 1	–	–	13.86	3/105	<0.001	0.28
Intercept	1.28	0.68	3.55	1/105	0.062	0.03
Pyramidal functions 2011	0.72	0.22	11.26	1/105	0.001	0.10
Bowel functions 2011	1.44	0.39	13.40	1/105	<0.001	0.11
Visual functions 2011	0.95	0.46	4.35	1/105	0.039	0.04
Model regression 2	–	–	11.27	5/41	<0.001	0.58
Intercept	3.17	0.85	0.05	1/41	0.831	0.00
Gadolinium-enhanced MRI scan	–4.00	1.09	13.48	1/41	0.001	0.25
<i>TNFB1B2</i> genotype	–2.00	0.82	5.99	1/41	0.019	0.13
Bowel functions 2011	2.07	0.47	19.39	1/41	<0.001	0.32
Visual functions 2006	0.97	0.38	6.54	1/41	0.014	0.14
Visual functions 2011	1.80	0.61	8.65	1/41	0.005	0.17

state, macrophages are present at the plaque edges [55]. Moreover, the BBB dysfunction hypothesis considers that oxidative stress and neuroinflammation when co-occurring with neurovascular dysfunction may cause subtle increases in BBB permeability which are associated with depression [58]. Thus, it may be that a condition characterized by chronic low-grade inflammation, subtle increases in BBB permeability, degeneration, and repair, is more likely to be accompanied by elevated depressive symptoms than the acute inflammatory state. Nevertheless, as described in the “Introduction,” during acute MS attacks, the increased production of IL-6, TNF- α , and IFN- γ is significantly associated with increased depression or severity of depression [32, 49]. Thus, it appears that depressive symptoms are related to cytokine production and immune-inflammatory markers not only during the acute phase of illness but also during the progressive course of illness, characterized by systemic inflammation, as shown in the present study, macrophage infiltration around the plaques, degenerative processes, and tissue repair. The continued immune-inflammatory disturbances in MS may explain that

depression in MS has often a chronic course in contrast to an episodic course in the general population [59].

The third major finding of this study is that the total EDSS score, the changes in the EDSS score over the last 5 years, and neurological symptoms of MS were significantly and positively associated with depression and/or severity of depressive symptoms. Some authors [60, 61] were unable to find significant correlations between the EDSS score and depressive scores. Most studies, however, found that MS patients with higher EDSS scores had significantly higher depression scores, while significant positive correlations were found between the EDSS and depression scores [62–68]. This is important as MS functional disability and especially depression predict physical health and quality of life [69–71]. Our findings showing that depression is associated with progression of MS, as measured with the EDSS over a 5-year period, extend those of previous reports. Thus, higher depression scores were detected in MS patients with disability progression [72]. We observed significant associations between the severity of depression and neurological symptoms, especially with gastrointestinal and visual

Table 6 Results of factor analysis, principal component (PC) method, on the neurological symptoms of multiple sclerosis and the Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) with and without quartimax rotation

Variables	Unrotated PC1	Rotated PC1	Rotated PC2	Rotated PC3
Pyramidal	<i>0.702</i>	<i>0.511</i>	<i>0.479</i>	0.201
Cerebellar	<i>0.542</i>	0.107	<i>0.829</i>	0.042
Brain stem	0.063	–0.067	0.132	<i>0.641</i>
Sensory	<i>0.467</i>	<i>0.628</i>	–0.107	0.007
Bladder	<i>0.536</i>	<i>0.491</i>	0.171	<i>0.443</i>
Intestinal	<i>0.661</i>	<i>0.718</i>	0.140	–0.216
Visual	<i>0.309</i>	<i>0.404</i>	–0.128	<i>0.561</i>
Cerebral	<i>0.407</i>	<i>0.363</i>	0.265	–0.556
Other	<i>0.514</i>	0.119	<i>0.775</i>	–0.085
HADS	<i>0.698</i>	<i>0.744</i>	0.193	–0.008
Explained variance (%)	27.5 %	21.8 %	17.8 %	13.5 %

The significant loadings (>0.300) are in italics

symptoms, but also with pyramidal and sensory symptoms. Irritable bowel syndrome, obstipation or diarrhea, and fecal incontinence are common symptoms in MS that are more prevalent when depression is present [73]. In fact, gastrointestinal symptoms in MS may be explained by underlying neuronal (brain or spinal) pathways or depression-related factors [73]. Interestingly, depression is accompanied by increased IgM and IgA responses to commensal bacteria, indicating increased bacterial translocation, and the same findings were made in MS patients [74–77]. Our factor analysis showed that depression loaded on a first unrotated factor, which indicates severity of the illness, together with all neurological symptoms, excluding cerebellar symptoms. Our findings strongly suggest that depression is part of the other symptoms of MS and thus is a symptomatic manifestation of MS. Nevertheless, the best prediction of depression severity was obtained when gastrointestinal symptoms and disability progression were combined with IL-6 and albumin. This may suggest that depression in MS is at least in part related to IL-6-mediated mechanisms and the pathophysiological processes that underpin gastrointestinal symptoms and the chronic inflammatory and degenerative processes that characterize disability progression.

The findings should be interpreted in the context of its strengths and limitations. In this study, we have controlled for the putative effects of sex, age, nicotine dependence, BMI, and the drug state of the patients, i.e., the use of disease-modifying drugs, glucocorticoids, and antidepressants. Thus, although these drugs have immune-modifying effects, we may exclude the possible effects on the associations reported in this study. A first limitation of this study already discussed above is the measurement of IL-6 without concomitant assay of the sIL-6R. Future research should measure serum IL-6, sIL-6R, and sgp130 levels together with MAPK and JAK/STAT expression in patients with MS with and without depression. A second limitation is that contrast enhancement on gadolinium MRI scan persists for only 2 to 6 weeks [53], and therefore, repeated MRI scans offer more information. In addition, future research should examine the prevalence of depression in relationship to increased levels of IO&NS biomarkers in different phases and different subtypes of MS with and without depression.

Acknowledgments This study is supported by the Health Sciences Postgraduate Program at the State University of Londrina, Brazil; the Ministry for Sciences and Technology of Brazil (CNPq); and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES). MM is supported by a special CNPq (National Council of Scientific and Technology), PVE fellowship, and the Health Sciences Postgraduate Program fellowship, Londrina State University (UEL).

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contributions All authors contributed equally to this paper.

References

- Gironi M, Borgiani B, Mariani E, Cursano C, Mendozzi L, Cavaretta R, Saresella M, Clerici M et al (2014) Oxidative stress is differentially present in multiple sclerosis courses, early evident, and unrelated to treatment. *J Immunol Res* 2014:961863
- Miller E, Walczak A, Saluk J, Ponczek MB, Majsterek I (2012) Oxidative modification of patient's plasma proteins and its role in pathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Biochem* 45:26–30
- Gonsette RE (2008) Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *J Neuro Sci* 274:48–53
- Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Bitzer-Quintero OK, Ramírez-Anguiano AC, Flores-Alvarado LJ, Ramírez-Ramírez V, Macías-Islas MA, Torres-Sánchez ED (2013) Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clin Dev Immunol* 2013:708659
- Morris G, Maes M (2013) Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome and encephalomyelitis disseminata/multiple sclerosis show remarkable levels of similarity in phenomenology and neuroimmune characteristics. *BMC Med* 11:205
- Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, Quattrocchi C, Mesáros S, Stojavljevic N, Nicoletti F, Drulovic J (2009) The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: the elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *J Neuroimmunol* 207:101–106
- Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao ML, Kopp N, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF et al (2006) IL-1beta regulates blood–brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J Immunol* 177:5574–5584
- Hauser SL, Doolittle TH, Lincoln R, Brown RH, Dinarello CA (1990) Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology* 40:1735–1739
- Sharief MK, Hentges R (1991) Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med* 325:467–472
- Al-Omaishi J, Bashir R, Gendelman HE (1999) The cellular immunology of multiple sclerosis. *J Leukoc Biol* 65:444–452
- Frei K, Fredrikson S, Fontana A (1991) Link H: interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 31:147–153
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33(11):1444–1452
- Oliveira SR, Kallaur AP, Simão AN, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, Petenucci DL, da Silva E et al (2012) Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neuro Sci* 321:49–53
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Cvetkovic T, Vojinovic S, Stojanovic D, Stojanovic D, Stefanovic N, Pavlovic D (2014) Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. *J Neuro Sci* 337:8–13
- Gajewski TF, Schell SR, Nau G, Fitch FW (1989) Regulation of T-cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunol Rev* 111: 79–110
- Murphy KM, Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2:933–944
- Imam SA, Guyton MK, Haque A, Vandenbark A, Tyor WR, Ray SK, Banik NL (2007) Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol* 190: 139–145
- Koguchi K, Anderson DE, Yang L, O'Connor KC, Kuchroo VK, Hafler DA (2006) Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 203:1413–1418

19. Rodriguez-Sainz Mdel C, Sanchez-Ramon S, de Andres C, Rodriguez-Mahou M, Munoz-Fernandez MA (2002) Th1/Th2 cytokine balance and nitric oxide in cerebrospinal fluid and serum from patients with multiple sclerosis. *Eur Cytokine Netw* 13:110–114
20. Kallaur AP, Oliveira SR, Simão AN, de Almeida ER, Morimoto HK, Alfieri DF, Pereira WL, Borelli SD et al (2014) Tumor necrosis factor beta NcoI polymorphism is associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 346:156–163
21. Fiorini A, Koudriavtseva T, Bucaj E, Coccia R, Foppoli C, Giorgi A, Schininà ME, Di Domenico F et al (2013) Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: the spectrum of oxidatively modified serum proteins detected by proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS One* 8:e65184
22. Encinas JM, Manganas L, Enikolopov G (2005) Nitric oxide and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5:232–238
23. Skokou M, Soubasi E, Gourzis P (2012) Depression in multiple sclerosis: a review of assessment and treatment approaches in adult and pediatric populations. *ISRN Neurol* 2012:427102
24. Feinstein A, Magalhaes S, Richard JF, Audet B, Moore C (2014) The link between multiple sclerosis and depression. *Nat Rev Neurol* 10(9):507–517
25. Maes M, Kubera M, Obuchowiczwa E, Goehler L, Brzeszcz J (2011) Depression's multiple comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro Endocrinol Lett* 32:7–24
26. Vattakatuchery JJ, Rickards H, Cavanna AE (2011) Pathogenic mechanisms of depression in multiple sclerosis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 23:261–276
27. Fragoso YD, Frota ER, Lopes JS, Noal JS, Giacomo MC, Gomes S, Gonçalves MV, da Gama PD et al (2010) Severe depression, suicide attempts, and ideation during the use of interferon beta by patients with multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol* 33(6):312–316
28. Ziemssen T, Bajenaru OA, Carrá A, de Klippel N, de Sá JC, Edland A, Frederiksen JL, Heinzl O et al (2014) A 2-year observational study of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis converting to glatiramer acetate from other disease-modifying therapies: the COPTIMIZE trial. *J Neurol* 261:2101–2111
29. Zigmond AS, Snaith P (1983) The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 67:361–370
30. Norton S, Cosco T, Doyle J, Done J, Sacker A (2013) The Hospital Anxiety and Depression Scale: a meta confirmatory factor analysis. *J Psychosom Res* 74:74–81
31. Maes M, Galecki P, Chang YS, Berk M (2011) A review on the oxidative and nitrosative stress (O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative processes in that illness. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35:676–692
32. Kahl KG, Kruse N, Faller H, Weiss H, Rieckmann P (2002) Expression of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma mRNA in blood cells correlates with depression scores during an acute attack in patients with multiple sclerosis. *Psychoneuroendocrinology* 27:671–681
33. Pokryszko-Dragan A, Frydecka I, Kosmaczewska A, Ciszak L, Bilinska M, Gruszka E, Podemski R, Frydecka D (2012) Stimulated peripheral production of interferon-gamma is related to fatigue and depression in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 114:1153–1158
34. Mohr DC, Goodkin DE, Isler J, Hauser SL, Genain CP (2001) Treatment of depression is associated with suppression of nonspecific and antigen-specific T(H)1 responses in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 58:1081–1086
35. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM et al (2005) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald criteria”. *Ann Neurol* 58:840–846
36. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E et al (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302
37. Lublin FD, Reingold SC (1996) 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* 46:907–911
38. Honarmand K, Feinstein A (2009) Validation of the Hospital Anxiety and Depression Scale for use with multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 15:1518–1524
39. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J (1998) Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin Chem* 44:679–681
40. 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
41. Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S (1996) Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin Chim Acta* 255:107–117
42. Majetschak M, Flohé S, Obertacke U, Schröder J, Staubach K, Nast-Kolb D, Schade FU, Stüber F (1999) Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Ann Surg* 230:207–214
43. Majetschak M, Obertacke U, Schade FU, Bardenheuer M, Voggenreiter G, Bloemeke B, Heesen M (2002) Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:1205–1211
44. Delongui F, Carvalho Grion CM, Ehara Watanabe MA, Morimoto HK, Bonametti AM, Maeda Oda JM, Kallaur AP, Matsuo T et al (2011) Association of tumor necrosis factor β genetic polymorphism and sepsis susceptibility. *Exp Ther Med* 2(2):349–356
45. Maes M, Vandewoude M, Scharpé S, De Clercq L, Stevens W, Lepoutre L, Schotte C (1991) Anthropometric and biochemical assessment of the nutritional state in depression: evidence for lower visceral protein plasma levels in depression. *J Affect Disord* 23:25–33
46. Maes M (1993) A review on the acute phase response in major depression. *Rev Neurosci* 4:407–416
47. Liu Y, Ho RC, Mak A (2012) Interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and soluble interleukin-2 receptors (sIL-2R) are elevated in patients with major depressive disorder: a meta-analysis and meta-regression. *J Affect Disord* 139(3):230–239
48. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL (2013) CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Affect Disord* 150:736–744
49. Koutsouraki E, Hatzifilipou E, Michmizos D, Cotsavasiloglou C, Costa V, Baloyannis S (2011) Increase in interleukin-6 levels is related to depressive phenomena in the acute (relapsing) phase of multiple sclerosis. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 23(4):442–448
50. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813:878–888
51. Maes M, Anderson G, Kubera M, Berk M (2014) Targeting classical IL-6 signalling or IL-6 trans-signalling in depression? *Expert Opin Ther Targets* 18:495–512
52. Bakshi R, Czamecki D, Shaikh ZA, Priore RL, Janardhan V, Kaliszky Z, Kinkel PR (2000) Brain MRI lesions and atrophy are related to depression in multiple sclerosis. *Neuroreport* 11:1153–1158

53. Rovira A, Auger C, Alonso J (2013) Magnetic resonance monitoring of lesion evolution in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 6(5):298–310
54. Cotton F, Weiner HL, Jolesz FA, Guttman CR (2003) MRI contrast uptake in new lesions in relapsing-remitting MS followed at weekly intervals. *Neurology* 60(4):640–646
55. Filippi M, Agosta F, Spinelli EG, Rocca MA (2013) Imaging resting state brain function in multiple sclerosis. *J Neurol* 260:1709–1713
56. Meier DS, Guttman CR (2003) Time-series analysis of MRI intensity patterns in multiple sclerosis. *Neuroimage* 20:1193–1209
57. Meier DS, Weiner HL, Guttman CR (2007) MR imaging intensity modeling of damage and repair in multiple sclerosis: relationship of short-term lesion recovery to progression and disability. *Am J Neuroradiol* 28:1956–1963
58. Najjar S, Pearlman DM, Devinsky O, Najjar A, Zagzag D (2013) Neurovascular unit dysfunction with blood–brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence. *J Neuroinflammation* 10:142
59. Koch MW, Patten S, Berzins S, Zhornitsky S, Greenfield J, Wall W, Metz LM (2015) Depression in multiple sclerosis: a long-term longitudinal study. *Mult Scler* 21:76–82
60. Alajbegovic A, Loga N, Tiro N, Alajbegovic S, Cindro V, Hozo I (2009) Cognitive and depressive disorders in multiple sclerosis. *Acta Clin Croat* 48:3–8
61. Koch M, Mostert J, Heerings M, Uyttenboogaart M, De Keyser J (2009) Fatigue, depression and disability accumulation in multiple sclerosis: a cross-sectional study. *Eur J Neurol* 16:348–352
62. Askari F, Ghajarzadeh M, Mohammadifar M, Azimi A, Sahraian MA, Owji M (2014) Anxiety in patients with multiple sclerosis: association with disability, depression, disease type and sex. *Acta Med Iran* 52:889–892
63. Gay MC, Vrignaud P, Garitte C, Meunier C (2010) Predictors of depression in multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand* 2010: 161–170
64. Finkelsztejn A, Cristovam Rdo A, Moraes GS, Lopes MG, Silva AV, Garcia MS, Cola CM, Bastiani CE et al (2009) Clinical features of multiple sclerosis in the south of Brazil: a partial analysis. *Arq Neuropsiquiatr* 67:1071–1075
65. Mattioli F, Bellomi F, Stampatori C, Parrinello G, Capra R (2011) Depression, disability and cognitive impairment in multiple sclerosis: a cross sectional Italian study. *Neurol Sci* 32:825–832
66. Mendes MF, Tilbery CP, Balsimelli S, Moreira MA, Barão-Cruz AM (2003) Depression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr* 61:591–595
67. Shen Y, Bai L, Gao Y, Cui F, Tan Z, Tao Y, Sun C, Zhou L (2014) Depressive symptoms in multiple sclerosis from an in vivo study with TBSS. *Biomed Res Int* 2014:148465
68. Tsivgoulis G, Triantafyllou N, Papageorgiou C, Evangelopoulos ME, Kararizou E, Sfagos C, Vassilopoulos D (2007) Associations of the Expanded Disability Status Scale with anxiety and depression in multiple sclerosis outpatients. *Acta Neurol Scand* 115:67–72
69. Ayatollahi P, Nafissi S, Eshraghian MR, Kaviani H, Tarazi A (2007) Impact of depression and disability on quality of life in Iranian patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 13:275–277
70. Chwastiak LA, Ehde DM (2007) Psychiatric issues in multiple sclerosis. *Psychiatr Clin N Am* 30:803–817
71. Lobentanz IS, Asenbaum S, Vass K, Sauter C, Klösch G, Kollegger H, Kristoferitsch W, Zeitlhofer J (2004) Factors influencing quality of life in multiple sclerosis patients: disability, depressive mood, fatigue and sleep quality. *Acta Neurol Scand* 110:6–13
72. Zephir H, De Seze J, Stojkovic T, Delisse B, Ferriby D, Cabaret M, Vermersch P (2003) Multiple sclerosis and depression: influence of interferon beta therapy. *Mult Scler* 9:284–288
73. Levinthal DJ, Rahman A, Nusrat S, O’Leary M, Heyman R, Bielefeldt K (2013) Adding to the burden: gastrointestinal symptoms and syndromes in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* 2013: 319201
74. Maes M, Kubera M, Leunis JC (2008) The gut-brain barrier in major depression: intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett* 29:117–124
75. Geffard M, Bodet D, Martinet Y, Dabadie MP (2002) Intérêt de l’évaluation d’IgM et d’IgA spécifiques circulant dans le sérum de malades atteints de sclérose en plaques (SEP). *Immuno Anal Biol Spéc* 17:302–310
76. Geffard M, Duleu S, Bessede A, Covenas R, Mangas A (2011) A new paradigm for multiple sclerosis. In: Geffard M (ed) *Multiple sclerosis. A new paradigm*. Nova Science Publishers 153–84
77. Bodet D, Glaize G, Dabadie MP, Geffard M (2004) Suivi immunobiologique de malades atteints de Sclérose en Plaques. *Immuno Anal Biol Spéc* 19:138–147

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- Biomarcadores IO&NS e o polimorfismo genético *NcoI* do *TNF-β* foram preditores do EDSS e responsáveis por mudanças nos escores do EDSS e sintomas piramidal, cerebelar e sensitivo durante 5 anos de acompanhamento. Desta forma, o aumento de TNF-α, IFN-γ, IL-10, AOPP, CL-LOOH, e NOx e a diminuição de IL-4 foram associados significativamente com aumento nos escores de EDSS. A progressão da EM foi positivamente correlacionada com aumento nos níveis de TNF-α, IFN-γ e sintomas piramidais. Os sintomas cerebelares foram significativamente e positivamente associados proteínas carbonílicas e IL-10 e negativamente associados com níveis de albumina. Os sintomas sensitivos foram significativamente e positivamente associados a IL-6. O polimorfismo genético *NcoI* do *TNF-β* não foi associado a mudanças no EDSS, sintomas cerebelares e sensitivos. No entanto, a presença do genótipo GA (TNFB1/B2) diminuiu o risco de alterações nos sintomas piramidais. Níveis aumentados de AOPP e NOx foram encontrados em pacientes com maiores EDSS quando comparados àqueles com menor EDSS. Nível aumentado de CL-LOOH é preditor dos escores de EDSS e nível aumentado de proteínas carbonílicas é preditor da disfunção cerebelar, após 5 anos de acompanhamento. Níveis aumentados de IL-6 e diminuídos de IL-4 e albumina foram associados com EM e depressão quando comparados com os obtidos em pacientes com EM sem depressão. Não foram encontradas diferenças nos níveis de biomarcadores do IO&NS em indivíduos com EM e depressão e com EM sem depressão. No entanto, níveis significativamente aumentados de CL-LOOH e NOx e níveis significativamente diminuídos de TRAP foram encontrados em pacientes com EM e depressão e com EM e sem depressão quando comparados com os controles;
- Foi observada uma significativa progressão na incapacidade e na gravidade dos sintomas piramidais, sensitivos e cerebelares avaliadas pelo EDSS após 5 anos de acompanhamento; além de um aumento significativo no escore de EDSS associado aos sintomas piramidais e cerebelares, mas não associado ao sensitivo. A idade mostrou-se um importante preditor do EDSS e alterações na função piramidal. Não foram observados efeitos significativos da forma clínica EMRR, tipo de tratamento (ausência de tratamento vs IFN-β vs acetato de glatiramer), glicocorticoides, lesões gadolínio-positivas, lesões na substância branca na incapacidade e progressão da doença avaliada pelo EDSS.
- O alelo A (TNFB2) do polimorfismo *NcoI* do *TNF-β* apresentou associação com a EM. O genótipo GA (TNFB1/B2) foi inversamente associado com a gravidade da depressão. A gravidade da depressão foi inversamente associada com a presença de lesões gadolínio-

positivas na RMN sugerindo que a lesão aguda e ruptura da BHE e, conseqüente inflamação aguda, está associada com menos sintomas depressivos;

- As mudanças nos escores de EDSS e os sintomas neurológicos foram significativamente e positivamente associados com depressão e gravidade dos sintomas depressivos. Portanto, elevados escores de depressão foram detectados em indivíduos com progressão da incapacidade. Associação significativa foi encontrada entre depressão e sintomas neurológicos, principalmente nos sistemas intestinal e visual. No entanto, não foi encontrada associação com sintomas piramidais e sensitivos. Estes resultados sugerem que a depressão é parte dos sintomas neurológicos da EM e que o aparecimento deste sintoma é influenciado pela inflamação periférica enquanto neuroinflamação aguda e o genótipo GA (TNFB1/B2) parecem desencadear papel protetor para o aparecimento dos sintomas depressivos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é o primeiro estudo que avalia o impacto do marcador genético (rs909253) e IO&NS no diagnóstico e evolução clínica da EM nesta coorte de pacientes e os resultados contribuem para um melhor entendimento da complexa interação entre fatores genéticos, IO&NS associados à fisiopatologia da EM quando se manifesta com ou sem depressão. Com isto, abrem-se perspectivas para a identificação de novos biomarcadores laboratoriais que possam ser utilizados na prática médica para a avaliação da progressão da doença e da sua heterogeneidade de sintomas e sistemas comprometidos na evolução clínica.

REFERENCIAS

- AL-OMAISHI, J.; BASHIR, R.; GENDELMAN, H.E. The cellular immunology of multiple sclerosis. *Journal of Leukocyte Biology*, 65:444–452, 1999.
- AMORINI, A.M.; PETZOLD, A.; TAVAZZI, B.; EIKELNBOOM, J.; KEIR, G.; BELLI, A.; et al. Increased of uric acid and purine compounds in biological fluids of multiple sclerosis patients. *Clinical Biochemistry* 42:1001–1006, 2009.
- ANDREWS, T.; ZHANG, P., BHAT, NR. TNF alpha potentiation IFN gamma-induced cell death in oligodendrocyte progenitors. *Journal of Neuroscience Research*, 54:574-583, 1998.
- ARGAW AT, ZHANG Y, SNYDER BJ, ZHAO ML, KOPP N, LEE SC, RAINE CS, BROSNAN CF et al (2006) IL-1beta regulates blood–brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *Journal of Immunology*, 177:5574–5584, 2006.
- ARNETT, H.A.; MASON, J.; MARINO, M.; SUZUKI, K.; MATSUSHIMA, G.K.; TING, J.P. TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature Neurosciences*, 4:1116–1122, 2001.
- ASKARI, F.; GHAJARZADEH, M.; MOHAMMADIFAR, M.; AZIMI, A.; ALI SABRAIN, M.; OWJI, M. Anxiety with multiple sclerosis: Association with disability, depression, disease type and sex. *Acta Medica Iranica*, 52(12): 889-892, 2014.
- BAGNATO, F.; HAMETNER, S.; YAO, G.; et al. Tracking iron in multiple sclerosis: a combined Imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain*, 134:3602-15, 2011.
- BECHER B; GIACOMINI PS, PELLETIER D, MCCREA E, PRAT A, ANTEL JP. Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Annals of Neurology*, 45: 247-250, 1999.
- BEGOLKA, W.S.; MILLER, S.D. Cytokines as intrinsic and exogenous regulators of pathogenesis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Research in Immunology*, 149, 771-781, 1998.
- BESLER, H.T.; COMOGLU, S. Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional Neuroscience*, 6:189-196, 2003.

BIELAU, H.; TRÜBNER, K.; KRELL, D.; AGELINK, M.W.; BERNSTEIN, H.G.; STAUCH, R. et al. Volume deficits of subcortical nuclei in mood disorders A postmortem study. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 255:401-412, 2005.

BJARTMAR, C.; TRAPP, B.D. Axonal and neuronal degeneration in multiple sclerosis: mechanisms and functional consequences. *Current Opinion in Neurology*, 14: 271–278, 2001.

BOTEGA NJ, BIO MR, ZOMIGNANI MA et al - Transtornos de humor em enfermarias de clínica médica e validação de escala de medida (HAD) de ansiedade e depressão. *Rev Saúde Pública*, 29:355-363, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº. 153, de 14 de junho de 2004. Brasília: Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial da União em 24/06/2004.

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. Accessed in July 16, 2013.*

BRASIL. Ministério da Saúde (BR). Portaria Nº 391, de 5 de maio de 2015. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. Diário Oficial União. 6 maio 2015; Seção 1:40.

BRINKMANN, V.; DAVIS, M.D.; HEISE, C.E.; ALBERT, R.; COTTENS, S.; HOF, R.; BRUNS, C.; PRIESCHL, E.; BAUMRUKER, T.; HIESTAND, P.; et al. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:21453–21457, 2002.

BRUCKLACHER-WALDERT V, STUERNER K, KOLSTER M, WOLTHAUSEN J, TOLOSA E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132:3329-3341, 2009.

CALABRESE, M.; MATTISI, I.; RINALDI, F.; FAVARETTO, A.; ATZORI, M.; BERNARDI, V.; BARACHINO, L.; ROMUALDI, C.; RINALDI, L.; PERINI, P.; GALLO, P. Magnetic resonance evidence of cerebellar cortical pathology in multiple sclerosis. *Journal of Neurology and Neurosurgery*, 81: 401-404, 2010.

CAMPBELL IL, STALDER AK, AKWA Y, PAGENSTECHER A, ASENSIO VC. Transgenic models to study the actions of cytokines in the central nervous system. *Neuroimmunomodulation*, 5: 126-135, 1998.

CANNELLA, B.; RAINE, CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 37(4): 424-435, 1995.

CARPINTERO, R.; BURGER, D. IFN- β and glatiramer acetate trigger different signaling pathways to regulate the IL-1 system in multiple sclerosis. *Communicative and Integrative Biology*, 4 (1): 112-114, 2011.

CHIURCHIU, V.; MACCARRONE, M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 15 (9): 2605–2641, 2011.

CHIURCHIU, V.; ORLACCHIO, A.; MACCARRONE, M. Is modulation of oxidative stress an answer? The state of the art of redox therapeutic actions in neurodegenerative diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016;2016:7909380.

COLE, J.; COSTAFREDA, S.G.; MCGUFFIN, P.; FU, C.H. Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Affective Disorders*, 134:483-487, 2011.

COLE, A.J.; FOX, E.; VLADIC, A GAZDA, S.K.; BRINAR, V.; SELMAJ K.W. Alemtuzumab more effectiveness than interferon beta 1a at 5-years follow up CAMMS223 clinical trial. *Neurology*, 78 (14): 1069-1078, 2012.

COMINI-FROTA ER, VASCONCELOS CCF, MENDES MF, on behalf of DCNI study group. Guideline for multiple sclerosis treatment in Brazil: Consensus from the Neuroimmunology Scientific Department of the Brazilian Academy of Neurology. *Arquivos Neuropsiquiatria*, 75(1):57-65, 2017.

CROSS, A.H.; MANNING, R.M.; KEELING, R.E.; SCHIMIDT, T.P. Peroxynitrite formation within the central nervous system in active multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 88: 45-56, 1998.

CUCCI A, BARBERO P, CLERICO M, FERRERO B, VERSINO E, CONTESSA G, DEMERCANTI S, VIGLIETTA E, DI LIBERTO A, VAI AG, DURELLI L. Pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA blood level in multiple sclerosis is related to treatment response and interferon-beta dose. *Journal of Neuroimmunology*, 226:150-157, 2010.

DELONGUI, F.; GRION, C.M.C.; WATANABE, M.A.E; MORIMOTO, H.K.; BONAMETTI, A.M.; ODA, J.M.M.; KALLAUR, A.P., MATSUO, T.; REICHE, E.M.V. Association of tumor necrosis factor beta (TNF- β) genetic polymorphism and sepsis susceptibility in Brazilian population. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2: 349-356, 2011.

DIHB-JALBUT S, ARNOLD DL, CLEVELAND DW, FISHER M, FRIEDLANDER RM, MOURADIAN MM, PRZEDBORSKI S, TRAPP BD, WYSS-CORAY T, YONG VW. Neurodegeneration and neuroprotection in multiple sclerosis and other neurodegenerative diseases. *Journal of Neuroimmunology*, 176:198-215, 2006.

EBERS, C.G.; SANDOVNICK, A.D. The role of genetic factor in multiple sclerosis susceptibility. *Journal of Neuroimmunology*, 54: 1-7, 1994.

EHLING, R.; GASSNER, C.; LUTTEROTTI, A.; STRASSER-FUCHS, S.; KOLLEGGER, H.; KRISTOFERITSCH, W.; REINDL, W.; BERGER, T.; Genetics variants in the tumor necrosis factor receptor II gene in patients with multiple sclerosis. *Tissue Antigens*, 63:28-33, 2003.

ENCINAS JM, MANGANAS L, ENIKOLOPOV G. Nitric oxide and multiple sclerosis. *Current Neurology and Neurosciences Report*, 5:232–238, 2005

FARJAM, M.; ZHANG, G.X.; CIRIC, B.; ROSTAMI, A. Emerging immunopharmacological targets in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 358:22-30, 2015.

FEINSTEIN A, MAGALHAES S, RICHARD JF, AUDET B, MOORE C. The link between multiple sclerosis and depression. *Nature Review Neurology* 10 (9):507–517, 2014.

FIORINI, A.; KOUDRIAVTSEVA, T.; BUCAJ, E.; COCCIA, R.; FOPPOLI, C.; GIORGI, A.; SCHININA, M.E.; DI DOMENICO F.; DE MARCO, F.; PERLUIGI, M. Involvement of oxidative stress in occurrence of relapses in multiple sclerosis: the spectrum of oxidatively modified serum proteins detected in proteomics and redox proteomics analysis. *PLoS One*, 8 (6):65184, 2013.

FRAGOSO YD, FROTA ER, LOPES JS, NOAL JS, GIACOMOMC, GOMES S, GONÇALVESMV, DA GAMA PD et al. Severe depression, suicide attempts, and ideation during the use of interferon beta by patients with multiple sclerosis. *Clinical Neuropharmacology*, 33(6):312–316, 2010.

FREI K, FREDRIKSON S, FONTANA A. Link H: interleukin-6 is elevated in plasma in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 31:147–153, 1991.

FRIEDMAN, J. Why is the nervous system vulnerable to oxidative stress? In: GADOTH, N.; GOBEL, H.H. (editors). In: *Oxidative stress and free radical damage in Neurology*. 1ª. edição, New York: Humana Press, 2011, p.19-21.

FUGGER, L., MORLING, N.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; RYDER, L.P.; SVEJGAARD, A. Tumor necrosis factor gene polymorphism in multiple sclerosis and optic neuritis. *Journal of Neuroimmunology*, 27:85-88, 1990.

GAJEWSKI TF, SCHELL SR, NAU G, FITCH FW. Regulation of T cell activation: differences among T-cell subsets. *Immunological Review*, 111: 79–110, 1989.

GILGUN-SHERKI, Y.; MELAMED, E.; OFFEN, D. The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology*, 251:261–126826, 2004.

GONSETTE, R.E. Neurodegeneration in multiple sclerosis: the role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of Neurological Science*, 274 (1-2): 48-53, 2008.

GONZALES-FLECHA, B.G.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver and muscle. *Free Radical Biology and Medicine*, 10: 93-100, 1991.

GOPAL, S.; MIKULSKIS, A.; GOLD, R.; FOX, R.J.; DAWSON, K.T.; AMARAVADI, L. Evidence os activation of the Nrf2 pathway in multiple sclerosis patients treated with delayed-release dimethyl fumarate in Phase 3 DEFINE and CONFIRM studies. *Multiple Sclerosis*, 2017. Doi:10.1177/1352458517690617.

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

HAMETNER S.; WIMMER I.; HAIDER, S.; PFEIFENBRING, W.; BRUCK, H.; LASSMAN, H. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Annals of Neurology*, 74:371-378, 2013.

HAUSER SL, DOOLITTLE TH, LINCOLN R, BROWN RH, DINARELLO CA. Cytokine accumulations in CSF of multiple sclerosis patients: frequent detection of interleukin-1 and tumor necrosis factor but not interleukin-6. *Neurology*, 40:1735–1739, 1990.

HONARMAND K, FEINSTEIN A. Validation of the Hospital Anxiety and Depression Scale for use with multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*, 15:1518-1524, 2009.

HU M-L, Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN and Simon MI (eds). *Methods in Enzymology*. California: Academic Press, 1994, pp. 380-382.

HUANG WX, HUANG P, HILLERT J. INCREASED EXPRESSION OF CASPASE-1 AND INTERLEUKIN-18 IN peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 10:482-487, 2004.

HUIZINGA, T. W. J.; WESTENDORP, R. G. J.; BOLLEN, E. L. E. M.; KEIJSERS, V.; BRINKMAN, B. M. N.; LANGERMANS, J. A. M.; BREEDVELD, F. C.; VERWEIJ, C.L.; VAN DE GAER, L.; DAMS, L.; CRUSIUS, J. B. A.; GARCÍA-GONZALEZ, A.; VAN OOSTEN, B. W.; POLMAN, C. H.; PEÑA, A. S. TNF- α promoter polymorphisms, production and susceptibility to multiple sclerosis in different group of patients. *Journal of Neuroimmunology*, 72:149-153, 1997.

IMAM SA, GUYTON MK, HAQUE A, VANDENBARK A, TYOR WR, RAY SK, BANIK NL. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. . *Journal of Neuroimmunology*, 190: 139–145, 2007.

IMITOLA, J.; CHTNIS, T.; KHOURY, S.J. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacology and Therapeutics*, 106:163 – 177, 2005.

IWAKURA Y, ISHIGAME H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, 116(5):1218-22, 2006.

KALLAUR, A.P.; KAIMEN-MACIEL, D.M.; MORIMOTO, H.K.; WATANABE, M.A.E.; REICHE, E.M.V. Genetic polymorphisms associated with the development and clinical course of multiple sclerosis. *International Journal of Molecular Medicine*, 4 (28): 467 – 479, 2011.

KALLAUR, A.P.; OLIVEIRA, S.R.; COLADO SIMÃO, A.N.; DELICATO DE ALMEIDA, E.R.; KAMINAMI MORIMOTO, H.; LOPES, J.; CARVALHO JENNINGS PEREIRA, W.L.; MARQUES DE ANDRADE, R.; MULITERNO PELEGRINO, L.; DONIZETE BORELLI, S.; KAIMEN-MACIEL, D.R.; VISSOCI REICHE, E.M. Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association with the progression and the activity of the disease. *Molecular Medicine Reports*, 7 (3): 1010-1020, 2013.

KALLAUR AP, OLIVEIRA SR, SIMÃO AN, DE ALMEIDA ER, MORIMOTO HK, ALFIERI DF, PEREIRAWL, BORELLI SD et al. Tumor necrosis factor beta *NcoI* polymorphism associated with inflammatory and metabolic markers in multiple sclerosis patients. *Journal of Neurological Sciences*, 346: 156–163, 2014.

KALLAUR AP, OLIVEIRA SR, SIMÃO AN, ALFIERI DF, FLAUZINO T, LOPES J, DE CARVALHO JENNINGS PEREIRA WL, DE MELECK PROENÇA C, BORELLI SD, KAIMEN-MACIEL DR, MAES M, REICHE EM. Cytokine Profile in Patients with Progressive Multiple Sclerosis and Its Association with Disease Progression and Disability. *Molecular Neurobiology*, 54(4): 2950-2960, 2017.

KAMALI-SARVESTANI, E., NIKSESERETSHT, E.; AFLAKI, E.; SARVARI, J.; GHARESI-FARD, B. TNF- α , TNF- β and IL-4 polymorphism in Iranian patients with multiple sclerosis. *Acta Neurológica Scandinava*, 115:161-166, 2007.

KANTARCI, O. H.; MORALES, Y.; ZIEMER, P. A.; HEBRINK, D. D.; MAHAD, D. J.; ATKINSON, E. J.; ACHENBACH, S. J.; ANDRADE, M.; MACK, M.; RANSOHOFF, R. M.; LASSMANN, H.; BRUCK, W.; WEINSHENKER, B. G.; LUCCHINETTI, C. F. CCR5 Δ 32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 169: 137-143, 2005.

KEARNEY, H.; MISZKIEL, K.A.; YIANNAKAS, M.C.; ALTMANN, D.R.; CICCARELLI, O.; MILLER. Grey matter involvement by focal cervical spinal cord lesions is associated with progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 22 (7):910-20, 2016.

KEMP, K.; REDONDO, J.; HARES, K.; RICE, C.; SCOLDING, N.; WILKINS, A. Oxidative injury in multiple sclerosis cerebellar grey matter. *Brain research*, 1642: 452-460, 2016.

KIM, M.J.; HAMILTON, J.P.; GOTLIB, I.H. Reduced caudate grey matter volume in women with major depressive disorder. *Psychiatry Research*, 164:114-122, 2007.

KOCH, M.; MOSTERT, J.; ARUTJUNYAN, A.V. et al. Plasma lipid peroxidation and progression of disability in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 14:529-533, 2007.

KOGUCHI K, ANDERSON DE, YANG L, O'CONNOR KC, KUCHROO VK, HAFLER DA. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *Journal of Experimental Medicine*, 203:1413–1418, 2006.

KUCHROO VK, DAS MP, BROWM JA, RANGER AM, ZAMVIL SS, SOBEL RA, WEINER HL, NABAVI N, GLIMCHER LH. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*, 80:707-718, 1995.

KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33: 1444-1452, 1983.

LANGEMANN, H; KABIERSCHE, A.; NEWCOMBE, J. Measurement of low-molecular weight antioxidants, uric acid, tyrosine and tryptophan in plaques and white matter from patients with multiple sclerosis. *European Neurology*, 32 (5): 248– 252, 1992.

LANSLEY, J.; MATAIX-COLS, D.; GRAU, M.; RADUA, J.; SASTRE-GARRIGA, J. Localized grey matter atrophy in multiple sclerosis: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies and associations with functional disability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37:819-830, 2013.

LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1862:506-510, 2016.

LEHNER, C; GEHWOLF, R; TEMPFER, H. et al. Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15 (5): 1305–1323, 2011.

LI, R.; REZK, A.; MIYAZAKI, Y.; HILGENBERG, E.; TOUIL, H.; SHENM, P., et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Science Translation Medicine*, 7 (310): 310ra166, 2015.

LJUBISAVLJEVIC S, STOJANOVIC I, CVETKOVIC T, VOJINOVIC S, STOJANOV D, STOJANOVIC D, STEFANOVIC N, PAVLOVIC D. Erythrocytes' antioxidative capacity as a potential marker of oxidative stress intensity in neuroinflammation. *Journal of Neurological Sciences*, 337:8–13, 2014.

LOCK C, HERMANS G, PEDOTTI R, BRENDOLAN A, SCHADT E, GARREN H, LANGER-
GOULD A, STROBER S, CANNELLA B, ALLARD J, KLONOWSKI P, AUSTIN A, LAD N,
KAMINSKI N, GALLI SJ, OKSENBERG JR, RAINE CS, HELLER R, STEINMAN L. Gene-
microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune
encephalomyelitis. *Nature Medicine*, 8:500-508, 2002.

LUCCHINETTI, C.F.; POPESCU, B.F.; BUNYAN, R.F.; MOLL, N.M.; ROEMER, S.F.;
LASSMANN, H.; BRUCK, W.; PARISI, J.E.; SCHEITHAUER, B.W.; GIAMINI, C.; WEISGAND,
S.D.; MANDREKAR, J.; RANSOHOFF, R.M. Inflammatory cortical demyelination in early multiple
sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 365: 321-322, 2011.

LUOMALA M, LEHTIMAKI T, HUHTALA H, UKKONEN M, KOIVULA T, HURME H,
ELOVAARA I. Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurologica
Scandinavica*, 108:296-400, 2003.

MAES M, GALECKI P, CHANG YS, BERK M. A review on the oxidative and nitrosative stress
(O&NS) pathways in major depression and their possible contribution to the (neuro)degenerative
processes in that illness. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35:676–
692, 2011a.

MAES M, KUBERA M, OBUCHOWICZWA E, GOEHLER L, BRZESZCZ J Depression's multiple
comorbidities explained by (neuro)inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. *Neuro
Endocrinological Letter* 32:7–24, 2011b.

MAHAD, D.H.; TRAPP, B.D.; LASSMANN, H. Pathological mechanisms in progressive multiple
sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14:183-193, 2015.

MAJETSCHAK, M.; FLOHÉ, S.; OBERTACKE, U.; SCHRÖDER, J.; STAUBACH K.; NAST-KOLB, D.; SCHADE, F.U.; STÜBER, F. Relation of a TNF gene polymorphism to severe sepsis in trauma patients. *Annals of Surgery*, 203:207-214, 1999.

MAJETSCHAK, M.; OBERTACKE, U.; SCHADE, FU.; BARDENHEURER, M.; VOGGENREITER, G.; BLOEMEKE, B.; HEESSEN, M. Tumor necrosis factor gene polymorphisms, leukocyte function, and sepsis susceptibility in blunt trauma patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9:1205-1211, 2002.

MARQUES, J. P. Esclerose Múltipla- Formas e fases da doença. In: PEDROSA, R. Introdução a Esclerose Múltipla: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa: Biogen Indec, 2010, p. 155-161.

MCDONALD, W. I.; RON, M. A. Multiple Sclerosis: the disease and its manifestations. *The Royal Society*, 354: 1615-1622, 1999.

MCDONALD, W. I.; COMPSTON, A.; EDAN, G.; GOODKIN, D.; HARTUNG, H. P.; LUBLIN, F. D.; MCFARLAND, H. F.; PATY, D. W.; POLMAN, C. H.; REINGOLD, S. C.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; SIBLEY, W.; THOMPSON, A. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology*, 50 (1): 121–7, 2001.

MEHTA, V.; PEI, W.; YANG, G., et al. Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis. *PLoS One*, 8: n.e57573, 2013.

MESSER, G.; SPENGLER, U.; JUNG, M.C.; HONOLD, G.; BLÖMER, K.; PAPE, G.R.; RIETHMÜLLER, G.; WEISS, E.H. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an *Nco1* polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. *Journal of Experimental Medicine*, 173:209-219, 1991.

MICHEL, L.; TOUIL H.; PIKOR, N.B.; GOMMERMAN, J.; PRAT, A.; BAR-OR, A. B cells in the multiple sclerosis central nervous system: trafficking and contribution to ANS-compartmentalizes inflammation. *Frontiers in Immunology*, 6: 1-12, 2015.

MIKULKOVA Z, PRAKSOVA P, STOURAC P, BEDNARIK J, MICHALEK J. Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neurological Sciences*, 300(1-2):135-41, 2011.

MORGEN, K.; SAMMER, G.; COURTNEY, S.M.; WOLTERS, T.; MELCHIOR, H.; BLECKER, C.R.; et al. Evidence for a direct association between cortical atrophy and cognitive impairment in relapsing-remitting MS. *Neuroimage*, 30: 891–898, 2006.

MOHR DC, GOODKIN DE, ISLAR J, HAUSER SL, GENAIN CP. Treatment of depression is associated with suppression of nonspecific and antigen-specific Th1 responses in multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 58:1081–1086, 2001.

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

MOUZAKI, A.; RODI, M.; DIMISIANOS, N.; EMMANUIL, A.; KALAVRIZIOTI, D.; LAGOUDAKI, R.; GRIGORIADIS, N.; PAPATHANASOPOULOS, P. Immune parameters that distinguish patients with multiple sclerosis from patients with other neurological disorders at presentation. *Plos One*, 10 (8): e0135434, 2015.

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

MYCKO, M.; KOWALSKI, W.; KWINKOVSKI, M.; BUENAFE, A. C.; SZYMANSKA, B.; TRONCZYNSKA, E.; PLUCIENNICZAK, A.; SELMAJ, K.; Multiple sclerosis: the frequency of allelic forms of tumor necrosis factor or lymphotoxin-alpha. *Journal of Neuroimmunology*, 84: 198-206, 1998.

NORTON S, COSCO T, DOYLE F, DONE J, SACKER A. The Hospital Anxiety and Depression Scale: a meta-confirmatory factor analysis. *Journal of Psychosomatic Research*, 74:74–81, 2013.

OLIVEIRA S.R.; KALLAUR A.P.; SIMÃO A.N.C, MORIMOTO, H.K.; LOPES, J.; PANIS, C.; PETENUCCI, D.L.; DA SILVA, E. et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *Journal of Neurological Sciences*, 321:49–53, 2012.

OLIVEIRA, S.R.; KALLAUR, A.P.; KAIMEN-MACIEL, D.R.; REICHE, E.M.V. Immunopathological mechanisms and oxidative stress damage in multiple sclerosis. In: Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases. CRC Press Taylor and Francis Group, p.549-588, 2014

OLIVEIRA, S.R.; KALLAUR, A.P.; REICHE, E.M.V.; KAIMEN-MACIEL, D.R.; PANIS, C.; LOZOVY, M.A.; MOLRIMOTO, H.K.; MAES, M.; DICHI, I.; SIMAO, A.N. Albumin and protein oxidation are predictors that differentiate relapsing-remitting from progressive clinical forms of multiple sclerosis. *Molecular Neurobiology*, 54(4): 2961-2968, 2017.

ORTIZ, G.G.; PACHECO-MOISES, F.P.; BITZER-QUINTERO, O.K.; RAMIREZANGUIANO, A.C.; FLORES-ALVARADO, L.J.; RAMIREZ-RAMINREZ, V.; MACIAS-ISLAS, M.A.; TORRES-SANCHEZ, E.D. Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013:708659, 2013.

PANIS, C.; MAZZUCO, T.; COSTA, C.Z.F. 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*, 127: 58-65, 2011.

PIRKO, I.; LUCCHINETTI, C.F.; SRIRAM, S.; BAKSHI, R. Gray matter involvement in multiple sclerosis. *Neurology*, 68: 634-642, 2007.

POKRYSZKO-DRAGAN A, FRYDECKA I, KOSMACZEWSKA A, CISZAK L, BILINSKA M, GRUSZKA E, PODEMSKI R, FRYDECKA D. Stimulated peripheral production of interferon-gamma is related to fatigue and depression in multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 114:1153-1158, 2012

POLMAN C.H.; REIGMOLD, S.C.; EDAN, G.; PILIPPI, M.; HARTUNG, H.P.; SCHIMIDT, H.; WILLIANSO, D.; ASHLEY-KOCH, A. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: A HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 165 (10): 1097-1109, 2005.

POLMAN, C.H.; REIGNOLD, S.C.; BANWELL, B.; CLANET, M.; COHEN, J.A.; FILIPPI, M.; FUJIHARA, K.; HAVRDOVA, E.; HUTCHINSON, M.; KAPPOS, L.; LUBLIN, F.D.; MONTALBAN, X.; O'CONNOR, P.; K.; O'CONNOR, P.W.; SANDBERG-WOLLHEIM, M.; THOMPSON, A.J.; WAUBANT, E.; WINSHENKER, B.G.; WOLINSKY, J.S. Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revision to the McDonald Criteria. *Annals of Neurology*, 292-302, 2010.

POSER, C. M. Multiple sclerosis, observations and reflections -a personal memoir. *Journal of the Neurological Sciences*, 107: 127–140, 1991.

POSSA, M.F.; MINACAPPELLI, E.; CANALE, S.; COMI, G.; MARTINELLI, V.; FALAUTANO, M. The first year after diagnosis: psychological impact on people with multiple sclerosis. *Psychology, Health and Medicine*, 6: 1-9, 2017, Doi:10.1080/13548506.2016.1274043.

POULY S, BECHER B, BLAIN M, ANTEL JP. Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59:280-286, 2000.

RAMOS-CEJUDO, J.; OREJA-GUEVARA, C.; AROEIRA, L.S.; DE ANTONIO, L.R.; CHAMORRO, B.; DIEZ-TEJEDOR, E. Treatment with natalizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis patients induces changes in inflammatory mechanism. *Journal of Clinical Immunology*, 31:623-631, 2011.

RANDOLPH, J.J.; ARNETT, P.A. Depression and fatigue in relapsing/ remitting MS: The role of symptomatic variability. *Multiple Sclerosis*, 11 (2): 186-190, 2005.

REDONDO, J.; KEMP, K.; HARES, K.; RICE, C.; SCOLDING, N.; WILKINS, A. Purkinje cell pathology and loss in multiple sclerosis cerebellum. *Brain Pathology*, 25 (6): 692-700, 2015.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, 255: 107-117, 1996.

RENTZOS, M.; NIKOLAOU, C.; ANAGNOSTOULI, M. et al. Serum uric acid and multiple sclerosis. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 108: 527-553, 2006.

REZNICK, A.Z.; PACCKER, L. Oxidative damage to protein: spectrophometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymology*, 233: 357-363, 1994.

RIECKMANN P, ALBRECHT M, KITZE B, WEBER T, TUMANI H, BROOCKS A, LÜER W, POSER S. Cytokine mRNA levels in mononuclear blood cells from patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 44:1523-1526, 1994.

RODRIGUEZ-SAINZ MDEL C, SANCHEZ-RAMON S, DE ANDRES C, RODRIGUEZ-MAHOU M, MUNOZ-FERNANDEZ MA (2002) Th1/Th2 cytokine balance and nitric oxide in cerebrospinal fluid and serum from patients with multiple sclerosis. *European Cytokine Network*, 13:110–114, 2002.

ROTH, M.P.; NOGUEIRA, L; COPPIN, H.; CLANET, M.; CLAYTON, J.; CAMBON-THOMSEN, A. Tumor necrosis factor polymorphism in multiple sclerosis: No additional association independent of HLA. *Journal of Neuroimmunology*, 51: 93-99, 1994.

SAMOILOVA EB, HORTON JL, CHEN Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. *Cell Immunology*, 188: 118-124, 1998.

SHARMA, S.; SHARMA, A.; KUMAR, S.; SHARMA, SK., GOSH, B Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 35: 488-495, 2006.

SKOKOUM, SOUBASI E, GOURZIS P. Depression in multiple sclerosis: a review of assessment and treatment approaches in adult and pediatric populations. *ISRN Neurology*, 2012:427102, 2012.

SPULER S, YOUSRY T, SCHELLER A, VOLTZ R, HOLLER E, HARTMANN M, WICK M, HOHLFELD R. Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *Journal of Neuroimmunology* 66 (1-2):57-64, 1996.

STEENWIJK MD, GEURTS JJ, DAAMS M, TIJMS BM, WINK AM, BALK LJ, TEWARIE PK, UITDEHAAG BM, BARKHOF F, VRENKEN H, POUWELS PJ. Cortical atrophy patterns in multiple sclerosis are non-random and clinically relevant. *Brain* 39(Pt 1):115-26, 2016.

STUKE, H.; HANKEN, K.; HIRSCH, J.; KLEIN, J.; WITTIG, F.; KASTRUP, A.; HILDEBRANDT, H. Cross-sectional and longitudinal relationship between depressive symptoms and brain atrophy in MS patients. *Frontiers in Human Neuroscience*, 10: 1-8, 2016.

SUAREZ-KURTZ G, PENA SD, STRUCHINER CJ, HUTZ MH. Pharmacogenomic diversity among Brazilians: influence of ancestry, self-reported color, and geographical origin. *Frontiers in Pharmacology*, 3:191, 2012.

SUVANNAVEJH, G.C.; LEE, H.O.; PADILLA, J.; DAL CANTO, M.C.; BARRET, T.A.; MILLER, S.D. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG (35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunology*, 205: 24–33, 2000.

SWEENEY CM, LONERGAN R, BASDEO AS, KINSELLA K, DUNGAN LS, HIGGINS SC, KELLY PJ, COSTELLOE L, TUBRIDY N, MILLS KH, FLETCHER JM. IL-27 mediates the response to IFN- β therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25:1170-1181, 2011.

TEDESCHI G, LAVORGNA L, RUSSO P, PRINSTER A, DINACCI D, SAVETTIERI G, QUATTRONE A, LIVREA P, MESSINA C, REGGIO A, BRESCIAMORRA V, OREFICE G, PACIELLO M, BRUNETTI A, CONIGLIO G, BONAVIDA S, DI COSTANZO A, BELLACOSA A, VALENTINO P, QUARANTELLI M, PATTI F, SALEMI G, CAMMARATA E, SIMONE IL, SALVATORE M, BONAVIDA V, ALFANO B. Brain atrophy and lesion load in a large population of patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 65 (2): 280-5, 2005.

TEUNISSEN, C.E.; TUMANI, H.; BENNETT, J.L.; BERVEN, F.S.; BRUNDIN, L.; COMABELLA, M.; FRANCIOTTA, D.; FEDERIKSEN, J.L.; FLEMING, J.O.; FURLAN, R.; HINTZEN, R.Q.; HUGHES, S.G.; JIMENEZ, C.R.; JOHNSON, M.H.; KILLESTEIN, J.; KRASULOVA, E.; KUHLE, J.; MAGNONE, M.C.; PETZOLD, A.; RAJDA, C.; REJDAK, K.; SCHMIDT, H.K.; VAN PESCH, V.; WAUBANT, E.; WOLF, C.; DEISENHAMMER, F.; GIOVANNONI, G.; HEMMER, B. Consensus guidelines for CSF and blood biobanking for CNS biomarkers studies. *Multiple Sclerosis International*, 2011: 246412, 2011.

TRENOVA, A.G.; MANOVA, M.G.; KOSTADINOVA, I. I.; HRSITOVA, D.R.; VASILEVA, T.V.; ZAHARIEV, Z.I. Clinical and laboratory study of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in women with multiple sclerosis. *Folia Medica*, 53: 29-35, 2011.

VALE, J. Esclerose Múltipla: Manifestações Clínicas. In: PEDROSA, R. Introdução a Esclerose Múltipla: Elaborado pelo grupo de estudos de esclerose múltipla da Sociedade Portuguesa de Neurologia. 1º Edição. Lisboa:Biogen Indec, 2010, p.131-150.

VAN BOXEL-DEZAIRE, A.H.; HOFF, S.C.; VAN OOSTEN, B.W. VERWEIJ, C.L.; DRÄGER, A.M.; ADÈR, H.J.; VAN HOUWELINGEN, J.C.; BARKHOF, F.; POLMAN, C.H.; NAGELKERKERN, L. Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 45: 695-703, 1999.

VAN HORSSSEN, J.; SCHREIBELT, G.; DREXHAGE, J. et al. Severe oxidative damage in multiple sclerosis lesion coincides with enhanced antioxidant enzyme expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 45:1729-1737, 2008.

VAN MEETEREN, M.E. TEUNISSEN, C.E.; DIJKSTRA, C.D. et al. Antioxidants and polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 59: 1347-1361, 2005.

VAN OOSTEN, B.W.; BARKHOF, F.; SCHOLTEN, P.E.; VON BKOMBERG, B.M.; ADER, H.J.; POLMAN, C.H. Increased production of tumor necrosis factor α , and not of interferon gamma, preceding disease activity in patients with multiple sclerosis. *Archives of Neurology*, 55: 793-798, 1998.

VAN WAGONER, N.J.; BENVENISTE, E.N. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 100: 124-139, 1999.

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

VATTAKATUCHERY JJ, RICKARDS H, CAVANNA AE. Pathogenic mechanisms of depression in multiple sclerosis. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 23:261–276, 2011.

VENTURINI D, SIMÃO AN, SCRIPES NA, BAHLS LD, MELO PA, BELINETTI FM, LOZOVY MA, DICHI I. Evaluation of oxidative stress in overweight subjects with or without metabolic syndrome. *Obesity (Silver Spring)* 20(12):2361-6, 2012.

VOSKUHL RR, GOLD SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Natural Reviews. Neurology*, 8(5):255-63, 2012.

WAXMAN, S.G. Cerebellar dysfunction in multiple sclerosis: evidence for an acquired channelopathy. *Prog Brain Res*, 148: 353-365, 2005.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Neurological Disorders: Public Health Challenges*, 2006.

WINDHAGEN A, NEWCOMBE J, DANGOND F, STRAND C, WOODROOF MN, CUZNER ML, HAFLER DA. Expression of costimulatory molecules B7 -1 (CD28), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions. *Journal of Experimental Medicine* 182: 1985-1996, 1995.

WINQUIST, R.J.; KWONG, A.; RAMACHANDRAN, R.; JAIN, J. *Biochemical Pharmacology*, 74: 1321-1329, 2007.

WITKO-SARSAT, V.; FRIEDLANDER, M.; CAPELLERE-BLANDIN, C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney International*, 49: 1304–1313, 1996.

WOLINSKY, J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of Neurology*, 58 (6): 840–846, 2005.

WU, C.; LEONG, S.Y.; MOORE, C.S.; CUI, Q.L.; GRIS, P.; BERNIER, L.P.; JONHSON, T.A.; SÉGUÉLA, P.; KENNEDY, T.E.; BAR-OR, A.; ANTEL, J.P. Dual effect of daily FTY720 on human astrocytes in vitro: relevant for neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 10:41, 2013.

YEDNOCK, T.A. et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*, 356 (6364): 63-66, 1992.

ZABEL, D. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders*. Summer, 4th RQ, Academic OneFile, p.531, 1995.

ZIGMOND AS, SNAITH RP - The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatrica, Scandinavica*, 67:361-370, 1983.

ZIEMSEN, T. Multiple sclerosis beyond EDSS: depression and fatigue. *Journal of Neurological Sciences*, 277 (Suppl 1): 537-541, 2009.

ZIEMSEN T, BAJENARU OA, CARRÁ A, DE KLIPPEL N, DE SÁ JC, EDLAND A, FREDERIKSEN JL, HEINZLEF O et al (2014) A 2-year observational study of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis converting to glatiramer acetate from other disease-modifying therapies: the COPTIMIZE trial. *Journal of Neurology*, 261:2101–2111

ZIPP, F.; WEBER, F.; HUBER, S.; SOTGIU, S.; CZLONKOWSKA, A.; HOLLER, E.; et al. Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Annals of Neurology*, 38: 723-730, 1995.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO A: Parecer do Comitê de ética em pesquisa em seres humanos da UEL

	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná Registro CONEP 268	
Parecer PF N°. 074/09 CAAE N°. 0070.0.268.000-09 FOLHA DE ROSTO N°. 251304	Londrina, 20 de abril de 2010.
PESQUISADORA: EDNA MARIA VISSOCI REICHE CCS/PAC	
Prezada Senhora: O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina/ Hospital Universitário Regional Norte do Paraná" (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96. do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto: "O PAPEL DO POLIMORFISMO GENÉTICO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL BETA (TNF-BETA) E O DESENVOLVIMENTO E CURSO CLÍNICO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA NA POPULAÇÃO BRASILEIRA"	
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 relatório final da pesquisa.	
Atenciosamente,  Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Coordenadora Comitê de Ética em Pesquisa-CEP/UEL	

APENDICE A: Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes com Esclerose Múltipla

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 1)

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

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

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

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

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

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

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

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

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua

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

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

Assinaturas

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

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

Profissional que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

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

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

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

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

Fone: 43-3371-2490

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 2)

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

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

compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

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

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

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

A amostra de sangue coletada durante a sua participação nestes dois projetos de pesquisa foi armazenada no *freezer*, sob a responsabilidade da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, no Laboratório de Análises Clínicas do HU, e foi identificada com número, sem a possibilidade da identidade do (a) senhor (a) ser revelada a outras pessoas que não participam do estudo. Solicitamos sua autorização para que esta amostra possa ser utilizada no desenvolvimento de um novo projeto de pesquisa para o estudo de um outro gene chamado fator de necrose tumoral beta (TNF-beta) para

avaliar se existe associação entre este gene e o desenvolvimento e progressão da esclerose múltipla. O mesmo estudo já foi realizado em outras populações mundiais mas não foi realizado na população brasileira, e os resultados poderão contribuir para o melhor conhecimento do desenvolvimento da doença assim como a possibilidade de se sugerir novas formas de tratamento da doença na nossa população.

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

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

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua participação. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

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

Assinaturas

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

Nome: _____

Assinatura: _____ **Local e data:** _____

Profissional que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____ **Local e data:** _____

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

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

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

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

Fone: 43-3371-2490

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 3)

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

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

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

A sua participação no estudo implica na utilização de uma amostra do seu sangue, que foi coletada durante sua participação em dois projetos de pesquisa desenvolvidos anteriormente, aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UEL, coordenados pelo professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel e com a participação de outros pesquisadores. Os projetos estudaram o papel de outros fatores genéticos, como o HLA e o CCR5, no desenvolvimento da esclerose múltipla. Estes projetos. O primeiro projeto foi sobre “Genotipagem do sistema de antígeno leucocitário humano (HLA) classe II em pacientes com esclerose múltipla” e teve como objetivo avaliar uma possível associação entre os genes do sistema HLA e a chance de desenvolvimento e curso clínico da esclerose múltipla (Parecer n. 206/05 de 15 de setembro de 2005). Com a amostra de

DNA extraído do sangue coletado, determinou-se os alelos dos genes do sistema HLA por métodos de biologia molecular. Os resultados obtidos demonstraram que existe uma associação do HLA com o risco de desenvolvimento e o curso clínico da esclerose múltipla e sugerem que o genótipo do HLA pode ser um biomarcador para a doença.

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

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

Sua decisão para **permitir a utilização da amostra armazenada é voluntária** e em qualquer momento o senhor (a) pode retirar o consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. Não haverá necessidade de coletar amostras de sangue específicas para este projeto de pesquisa. **Informamos ao senhor (a) que, após o encerramento deste projeto de pesquisa, o material NÃO será armazenado para uso futuro.**

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

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua participação. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de que será informado sobre os resultados da análise genética do gene TNF, objeto deste estudo, durante o seu atendimento, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

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

Assinaturas

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

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

Profissional que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

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

Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440; Fone: 43-3371-2321 (Imunologia), 43-3371-2670 (Diagnóstico Molecular)

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

Fone: 43-3371-2490

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE 4)

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

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, de um projeto de pesquisa com o título “O papel do polimorfismo genético do fator de necrose tumoral beta (TNF- β) e o desenvolvimento e curso clínico de esclerose múltipla, na população brasileira”. O estudo será desenvolvido sob a coordenação da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche do departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da UEL (telefone 43-3371-2321) com a colaboração do professor Dr. Damacio Ramón Kaimen-Maciel, do departamento de

Clínica Médica do Centro de Ciências da Saúde (43-3371-2234) e demais professores da UEL. Cabe ao (a) senhor (a) decidir se pretende participar ou não. Caso não tenha condições de ler e/ou compreender as informações contidas neste termo, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da sua família ou responsável legal.

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

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

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

A amostra de sangue coletada durante a sua participação nestes dois projetos de pesquisa foi armazenada no *freezer*, sob a responsabilidade da professora Dra. Edna Maria Vissoci Reiche, no Laboratório de Análises Clínicas do HU, e foi identificada com número, sem a possibilidade da identidade do (a) senhor (a) ser revelada a outras pessoas que não participam do estudo. Solicitamos

sua autorização para que esta amostra possa ser utilizada no desenvolvimento de um novo projeto de pesquisa para o estudo de um outro gene chamado fator de necrose tumoral beta (TNF-beta) para avaliar se existe associação entre este gene e o desenvolvimento e progressão da esclerose múltipla. O mesmo estudo já foi realizado em outras populações mundiais mas não foi realizado na população brasileira, e os resultados poderão contribuir para o melhor conhecimento do desenvolvimento da doença assim como a possibilidade de se sugerir novas formas de tratamento da doença na nossa população.

Sua decisão para permitir a utilização da amostra armazenada é voluntária e em qualquer momento o senhor (a) pode retirar o consentimento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição. Não haverá necessidade de coletar amostras de sangue específicas para este projeto de pesquisa. Informamos ao (a) senhor (a) que, **após o encerramento deste projeto de pesquisa, o material NÃO será armazenado para uso futuro.**

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

Declara que está completamente esclarecido sobre a forma como a pesquisa será realizada, não tendo nenhuma dúvida sobre sua natureza e a ausência de riscos na sua participação. Declara também que está ciente de que sua participação é voluntária, de não terá nenhum ônus e de que poderá se recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento sem que haja penalização ou prejuízo algum para seu atendimento e tratamento. Está ciente também que o seu tratamento continuará sendo conduzido pelo seu médico e que nenhum pagamento ou benefício será feito ao participante ou aos familiares pela participação no presente estudo.

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

Assinaturas

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

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

Profissional que obteve o TCLE

Nome: _____

Assinatura: _____ Local e data: _____

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

Endereço: Departamento de Patologia, Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde, Hospital Universitário de Londrina. Av. Robert Koch, 60, Vila Operária, CEP 86038-440; Fone: 43-3371-2321 (Imunologia), 43-3371-2670 (Diagnóstico Molecular). Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina: Fone: 43-3371-2490

ANEXO B: Questionário Projeto EM

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

Pós Menopausa	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Data última menstruação:
---------------	---	--------------------------