



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Lana Márcia Ferreira Lopes**

**Análise comparativa do tratamento com fingolimode e  
dimetilfumarato na frequência de diferentes subtipos de linfócitos  
B, monócitos e subtipos de células T em pacientes com  
Esclerose Múltipla**

Rio de Janeiro

2020

Lana Márcia Ferreira Lopes

**Análise comparativa do tratamento com fingolimode e dimetilfumarato na  
composição de linfócitos B, monócitos e diferentes subtipos de células T em  
pacientes com Esclerose Multipla**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Cleonice Alves de Melo Bento  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Joana Hygino da Silva Machado

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

L864 Lopes, Lana Márcia Ferreira.  
Análise comparativa do tratamento com fingolimode e dimetilfumarato na composição de linfócitos B, monócitos e diferentes subtipos de células T em pacientes com Esclerose Múltipla / Lana Márcia Ferreira Lopes.- 2020.  
77 f.

Orientadora: Cleonice Alves de Melo Bento  
Coorientadora: Joana Hygino da Silva Machado

Dissertação (Mestrado) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Esclerose Múltipla – Teses. 2. Linfócitos T. 3. Linfócitos B. 4. Monócitos. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II. Machado, Joana Hygino da Silva. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.8

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Lana Márcia Ferreira Lopes

**Análise comparativa do tratamento com fingolimode e dimetilfumarato na  
composição de linfócitos B, monócitos e diferentes subtipos de células T em  
pacientes com Esclerose Múltipla**

Dissertação apresentada, como requisito parcial  
para obtenção do título de Mestre, ao Programa  
de Pós-Graduação em Microbiologia, da  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área  
de concentração: Microbiologia Médica  
Humana.

Aprovada em 06 de março de 2020.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cleonice Alves de Melo Bento  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Joana Hygino da Silva Machado  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Dra. Taissa de Matos Kasahara  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Dra. Juliana Calvet Kallenbach Aurenção  
Hospital dos Servidores do Estado

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Regis Mariano de Andrade  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos graduandos, pós-graduandos, professores e pesquisadores que vivem o obscurantismo decretado pelo atual governo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço todas forças superiores que permitiram estar aqui e realizar este trabalho.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços pra que eu pudesse ter uma educação de qualidade. Muito obrigada por tudo!

Às minhas irmãs, Li e La. Descrever o quanto sou grata por ter vocês comigo é algo difícil. Obrigada por serem meu porto seguro.

À minha orientadora Cléo, por todo ensinamento no âmbito profissional e por TUDO que fez e faz por mim fora do ambiente de trabalho. Talvez, um dia, consiga mensurar minha gratidão.

À minha coorientadora Joana, por toda paciência e ensinamento.

À todos do LIIiLiT, Taissa, Pri, Clarice, Aleida, Marisa, Camila, Fabi, Ana, Mila por todo ensinamento, paciência e experiência; Marcos e Hugo, por todo companheirismo, cumplicidade e honestidade. Em tantos altos e baixos, sobrevivemos. Obrigada a todos vocês, família LIIiLiT por fazerem nosso ambiente de trabalho um lugar especial.

À Carol, por ser uma das melhores surpresas do ano passado e por toda paz e tranquilidade trazidas.

Aos meu amigos de Minas, meu encontro de almas, Rê, Ju, Rafa, Ray, May e Bráulio, por personificar o conceito de estabilidade.

A todos os amigos da graduação e pós, por tornarem a vida acadêmica mais tranquila. Em especial, Vitor, Taissa e Marcos, obrigada por estarem comigo em momentos complicados e permanecerem durante a calmaria.

À Priscila Heusner, por ser fundamental e por me ajudar a superar cada obstáculo.

À Dra Cláudia Vasconcelos e Larissa Resende, por toda contribuição e ajuda durante a execução do trabalho.

Aos pacientes que aceitaram participar deste estudo.

A todos funcionários, principalmente da UERJ e UNIRIO, que lutam para manter a universidade pública.

Às agências de fomento, CAPES, FAPERJ, CNPq, espero que sobrevivam ao caos.

A todos que contribuíram, de alguma forma, muito obrigada!

Hello darkness, my old friend, I've come to talk with you  
again because a vision softly creeping, left its seeds while I was  
sleeping. And the vision that was planted in my brain still remains  
within the sound of silence.

*Simon & Garfunkel*

## RESUMO

LOPES, Lana Márcia Ferreira. **Análise comparativa do tratamento com fingolimode e dimetilfumarato na composição de linfócitos B, monócitos e diferentes subtipos de células T em pacientes com Esclerose Múltipla**. 2020. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Esclerose Múltipla remitente recorrente (EMRR) é uma doença autoimune inflamatória crônica do Sistema Nervoso Central considerada a principal causa, entre as doenças desmielinizantes, de incapacidade neurológica crônica em adultos jovens. O rápido diagnóstico e início do tratamento com terapias modificadoras da doença (TMD), tais como fingolimode (FGL) e dimetilfumarato (DMF), pode alterar o curso clínico por controlar, através de diferentes mecanismos, eventos imunes mediados pelas células T encefalitogênicas associados às recaídas e lesão neuronal. Entretanto, faltam estudos comparando os efeitos de ambas as drogas na composição de diferentes subtipos de células T, células B e monócitos circulantes, sendo esse o objetivo do presente trabalho. Para tal, os linfócitos totais foram estimulados por 3 h com a combinação de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina, seguida de marcação de diferentes anticorpos monoclonais fluoroceínados dirigidos contra os marcadores CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, IFN- $\gamma$ , CD19, HLA-DR, CD28, CD57, CD14, CD80, CD86 e CD11c. Para fins de comparação, amostras de sangue periférico foram colhidas de indivíduos saudáveis (grupo controle) e de pacientes infectados pelo HIV-1 com Aids. A determinação das diferentes subpopulações celulares foi conduzida por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que o tratamento com FGL foi mais eficiente em reduzir tanto a porcentagem total das células T CD4<sup>+</sup> periféricas, quanto o subtipo de memória central. No compartimento das células T CD8<sup>+</sup>, resultados semelhantes foram observados nos pacientes sob terapia com FGL. A frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) INF- $\gamma$ <sup>+</sup> foi maior nos pacientes não tratados do que no grupo controle, e dentre as TMD, apenas o FGL reduziu a proporção de células T CD8<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens, associado a um aumento na fração de células T(CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) D28<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> circulantes. A incapacidade do DMF em reduzir os níveis circulantes de células T INF- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens foi diretamente associada ao grau de comprometimento motor do paciente. Quanto aos monócitos (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), o FGL foi superior ao DMF em aumentar a porcentagem dessas células expressando os marcadores de ativação CD80 e CD11c, respectivamente. Finalmente, e de forma interessante, apesar do FGL levar a uma linfopenia mais acentuada nas células T de memória central circulantes nos pacientes com EM quando comparada aos pacientes com Aids, é provável que aumento na proporção de células T CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> e de monócitos ativados (CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>), deva contribuir na resistência imune a diferentes patógenos nos pacientes com EM. Apesar de preliminares, nossos dados sugerem que, maior eficiência terapêutica na EM dependa da capacidade da TMD em reduzir a frequência de células T INF- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens. Ademais, apesar do FGL levar a uma queda importante em subtipos nobres de células T circulantes, é possível que, por mecanismos imunes compensatórios, a grande maioria desses pacientes consigam manter ainda vigilância imune contra diferentes patógenos.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Linfócitos T. Linfócitos B. Monócitos. Tratamento.



## ABSTRACT

LOPES, Lana Márcia Ferreira. **Fingolimod and dimethyl fumarate alters functional profile of T cell, B cell and monocytes in patients with multiple sclerosis**. 2020. 77f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Recurrent remitting multiple sclerosis (RRMS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system considered to be the main cause, among demyelinating diseases, of chronic neurological disability in young adults. The rapid diagnosis and treatment with disease-modifying therapies (TMD), such as fingolimod (FGL) and dimethylfumarate (DMF), can alter the clinical course by controlling, through different mechanisms, immune events mediated by encephalitogenic T cells associated with relapses and neuronal injury. However, studies comparing the effects of both drugs on the composition of different T cell subsets, B cells and circulating monocytes are lacking, which is the objective of the present study. Thus, the total lymphocytes were stimulated for 3 h with the combination of PMA and ionomycin and subsequently labeled using different fluoroclated monoclonal antibodies directed against the CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7, IFN- $\gamma$ , CD19, HLA-DR, CD28, CD57, CD14, CD80, CD86 and CD11c markers. For comparison, peripheral blood samples were collected from healthy individuals (control group) and from HIV-1 infected patients with AIDS. The determination of different cell subpopulations was carried out by flow cytometry. Our results demonstrate that treatment with FGL was more efficient in reducing both the total CD4<sup>+</sup> T cells and the central memory cell subset. In the CD8<sup>+</sup> T cell compartment, similar results were observed in patients with FGL therapy. The frequency of IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) T cells was higher in untreated MS patients than in the control group, and, among TMD, only FGL was capable in reducing the proportion of virgin IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T cells, associated with an increase in the frequency of circulating CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>(CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) T cells. Inability of DMF of reducing circulating levels of virgin IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells was directly associated with the degree of motor impairment of the patient. Different from DMF, FGL was able to elevate the proportions of monocytes (CD14<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) and B lymphocytes (CD19<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) expressing the activation markers CD80 and CD11c, respectively. Finally, and interestingly, although FGL leads to more pronounced lymphopenia in circulating central memory T cells in patients with MS compared to AIDS patients, an increase in the proportion of CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> T cells and activated monocytes (CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup>) should contribute to immune resistance to different pathogens in patients with MS. Although preliminary, our data suggest that higher therapeutic efficiency in MS depends on the ability of TDM to reduce the frequency of virgin T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> cells. In addition, although FGL leads to an important reduction in noble circulating T cell subtypes, it is possible that, by compensatory immune mechanisms, the great majority of these patients are able to maintain immune surveillance against different pathogens.

Keywords: Multiple sclerosis. T lymphocytes. B lymphocytes. Monocytes. Treatment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ativação dos linfócitos T.....	17
Figura 2 - Apresentação de antígenos pelos linfócitos B.....	18
Figura 3 - Diferenciação dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e T CD8 <sup>+</sup> .....	21
Figura 4 - As células T reguladoras e a homeostase imune.....	25
Quadro 1 - Sistemas Funcionais.....	29
Figura 5 - Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke .....	30
Tabela 1 - Características dos pacientes e indivíduos saudáveis .....	43
Figura 6 - Estratégia de confinamento dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> .....	45
Figura 7 - Porcentagem de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> circulantes em pacientes com EM.....	46
Figura 8 - Porcentagem de diferentes subtipos de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> circulantes em pacientes com EM.....	47
Figura 9 - Análise da frequência de células T com expressão diferencial de CD28 e CD57 .....	49
Figura 10 - Porcentagem de diferentes subtipos de células TCD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> em pacientes com EM sob terapia com DMF e FGL	50
Tabela 2 - Correlação entre subtipos celulares e EDSS .....	51
Figura 11 - Porcentagem de diferentes subtipos de células T circulantes em pacientes com EM tratados com FGL e pacientes com AIDS .....	52
Figura 12 - Análise do <i>status</i> de ativação dos monócitos em pacientes com EM sem tratamento ou tratados com DMF ou FGL .....	53
Figura 13 - Estratégia de confinamento dos linfócitos B .....	54
Figura 14 - Análise da frequência de linfócitos B capazes de expressar CD86, CD83 e CD11c em pacientes com EM sem tratamento ou tratados com DMF ou FGL .....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AAN – *American Academy of Neurology*
- ABN – Academia Brasileira de Neurologia
- AHR – do inglês *aryl hydrocarbon receptor*
- AIDS – do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AP - do inglês *activator protein*
- APC - do inglês *antigen presenting cells*
- ARE - do inglês *antioxidant response element*
- ATP – adenosina trifosfato
- BAFF - do inglês *B-cell activating factor*
- BCR - do inglês *B cell receptor*
- BHE – barreira hematoencefálica
- Blimp-1 – do inglês *PR domain zinc finger protein 1*
- BOC – bandas oligoclonais
- Breg – linfócitos B reguladores
- CCL - do inglês *C-C Motif Chemokine Ligand*
- CCR - do inglês *C-C chemokine receptor*
- CD – do inglês *cluster of differentiation*
- CHI3L1 – do inglês *Chitinase 3-like 1*
- CIS - do inglês *Clinically isolated syndrome*
- CTL – do inglês *cytotoxic T lymphocytes*
- CTLA-4 – do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
- CXCL – do inglês *chemokine C-X-C motif ligand*
- CXCR – do inglês *C-X-C chemokine receptor*
- DC - do inglês *dendritic cells*
- DMF – dimetilfumarato
- EDSS - do inglês *Expanded Disability Status Scale*
- EM – esclerose múltipla
- EMPP – Esclerose Múltipla Primária Progressiva
- EMRR – Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
- EMSP – Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
- FDC - do inglês *follicular dendritic cells*

Foxo 1 – do inglês *Forkhead box protein O1*

FoxP3 – do inglês *forkhead box P3*

FS - do inglês *functional systems*

FYT720 – fingolimode

GATA - do inglês *trans-acting T-cell-specific transcription factor*

GITR - do inglês *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18* ou *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*

GM-CSF – do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HDL – do inglês *high density lipoprotein*

HERV - do inglês *human endogenous retroviruses*

HLA - do inglês *human leukocyte antigen*

HSCT – do inglês *hematopoietic stem cell transplantation*

ICOS – do inglês *inducible t-cell costimulator*

IFN – interferon

Ig - do inglês *Immunoglobulin*

IL – Interleucina

IRF4 - do inglês *Interferon Regulatory Factor 4*

iTreg – linfócitos T reguladores induzidos

Keap-1 - do inglês *Kelch-like ECH protein 1*

LCR – líquido cefalorraquidiano

LEMP – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

MBP - do inglês *myelin basic protein*

mDC – células dendríticas mieloides

MEDA - do inglês *minimal evidence of disease activity*

MHC - do inglês - *major histocompatibility complex*

MMP - do inglês *matrix metalloproteinases*

MOG - do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*

NEDA - do inglês *no evidence of disease activity*

NF-AT - do inglês *Nuclear factor of activated T-cells*

NfL - do inglês *neurofilament light chain*

NF-κB - do inglês *nuclear factor kappa B*

NK - do inglês *natural killer*

Nrf2 - do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

nTreg – linfócitos T reguladores naturais

PAMP – do inglês *pathogen-associated molecular patterns*  
PD-1 – do inglês *programmed death-ligand 1*  
pDC – células dendríticas plasmocitoides  
PEG – polietilenoglicol  
PLP - do inglês *proteolipid protein*  
RIS - do inglês *Radiologically isolated syndrome*  
RORC – do inglês *RAR-related orphan receptor C*  
ROR $\alpha$  - do inglês *RAR-related orphan receptor alpha*  
ROR $\gamma$ t - do inglês *RAR-related orphan receptor gamma*  
ROS – do inglês *reactive oxygen species*  
S1P – do inglês *Sphingosine-1-phosphate*  
SBN – Sociedade Brasileira de Neurologia  
SNC – Sistema Nervoso Central  
T-bet - do inglês *T-box transcription fator*  
Tc – do inglês *T cytotoxic*  
TCR - do inglês *T cell receptor*  
TDM – Terapias Modificadoras da Doença  
T<sub>EMRA</sub> – Células T terminalmente diferenciadas  
T<sub>FH</sub> - do inglês *T follicular helper*  
TGF- $\beta$  - do inglês *transforming growth factor beta*  
Th – do inglês *T helper*  
TLR – do inglês *Toll like receptor*  
T<sub>MC</sub> – Células T de memória Central  
T<sub>ME</sub> – Células T de memória efetora  
T<sub>N</sub> – Células T naive  
TNF – do inglês *tumor necrosis fator*  
Treg – linfócitos T reguladores  
VCAM - do inglês *vascular cell adhesion protein*  
VEGF – do inglês *vascular endothelial growth fator*

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico

α – alfa

β – beta

γ – gama

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
1.1	<b>Geral</b> .....	38
1.2	<b>Específicos</b> .....	38
2	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
2.1	<b>Pacientes</b> .....	39
2.2	<b>Obtenção e estimulação das células do sangue periférico</b> .....	39
2.3	<b>Análise fenotípica por citometria de fluxo</b> .....	39
2.4	<b>Análises estatísticas</b> .....	41
3	<b>RESULTADOS</b> .....	42
3.1	<b>Características gerais dos grupos estudados</b> .....	42
3.2	<b>As terapias alteram os subtipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup></b> .....	43
3.3	<b>Papel da TMD em modular a produção de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> senescentes produtoras de INF-<math>\gamma</math></b> .....	47
3.4	<b>O fingolimode é mais potente que o vírus HIV-1 em reduzir a porcentagem de células T de memória central circulantes</b> .....	51
3.5	<b>A terapia com fingolimode eleva a proporção de monócitos ativados</b> .....	52
3.6	<b>O fingolimode aumenta a frequência de células CD11c<sup>+</sup></b> .....	54
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	64
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65
	<b>ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	74

## INTRODUÇÃO

### Considerações Gerais

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória, desmielinizante crônica e progressiva do sistema nervoso central (SNC), com curso clínico variável e heterogêneo, diagnosticada entre os 20 e 50 anos, tendo, portanto, um forte impacto socioeconômico. É mais comum em mulheres (proporção de 2-3:1) e caucasianos, nos países ao norte e ao sul da linha do Equador (G. K. *et al.*, 2019).

Embora sua etiologia permaneça não totalmente conhecida, sabe-se que a EM resulta de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais que determinam alterações imunológicas desencadeando fenômenos de autoimunidade, tendo como alvo principal a bainha de mielina (PAUNOVIC *et al.*, 2018).

É a patologia primária mais frequente do SNC, caracterizada pela inflamação e desmielinização no parênquima cerebral, degeneração axonal e gliose, conferindo também, um caráter neurodegenerativo (COURTEN; MATSOUKAS; APOSTOLOPOULOS, 2017). Apesar da evolução e gravidade da doença não serem uniformes, a maioria dos pacientes com EM (85 - 90%) apresenta a forma remitente-recorrente (RR), caracterizada por recaídas clínicas seguidas de remissões (DECKX *et al.*, 2013).

Estudos em modelos animais e achados em pacientes têm demonstrado uma participação importante das células T específicas para antígenos da bainha de mielina na gênese das lesões desmielinizantes características da EM. Como as lesões podem se formar em qualquer local do SNC, os sintomas relacionados à doença são heterogêneos e imprevisíveis (COURTEN; MATSOUKAS; APOSTOLOPOULOS, 2017; DENIC *et al.*, 2010; FLETCHER, 2013).

Atualmente, há grande interesse na investigação quanto a implicação das células B no desenvolvimento e progressão da EM, principalmente após a observação de resultados positivos na depleção desses linfócitos, utilizando anticorpos monoclonais (MCWILLIAM; SELLEBJERG; MARQUART, 2018). A terapia com anticorpos monoclonais pertence a um grupo de drogas direcionadas ao tratamento de pacientes com EM, conhecidas como terapias modificadoras da doença (TMD), utilizadas na fase de remissão, com objetivo de reduzir o risco e severidade das recaídas clínicas. No Brasil, os fármacos aprovados pela Agência



Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: Acetato de Glatirâmer, Interferon (IFN)- $\beta$ 1b, IFN- $\beta$ 1a,  $\beta$ -peginterferon1a, Natalizumabe, Ocrelizumabe, Alentuzumabe, Cladribina, Teriflunomida, Dimetilfumarato (DMF) e Fingolimode (FGL) (MARQUES *et al.*, 2018).

Enquanto DMF parece agir reduzindo a inflamação, o fingolimode altera o padrão de recirculação de diferentes subtipos de linfócitos T e interfere na homeostase das células B. Até o momento, nenhum estudo comparou os efeitos dessas duas terapias orais, que são as mais utilizadas atualmente, em diferentes subtipos de células T, B e monócitos circulantes, em pacientes com EM.

### **Ativação das Células T**

Classicamente, o sistema imune, através de interações entre diferentes elementos celulares, é capaz de identificar, eliminar e/ou confinar diferentes estímulos estranhos capazes de perturbar a homeostase. Dentre todos os leucócitos, os linfócitos T ocupam uma posição de destaque por regular a capacidade funcional de diferentes células da imunidade inata e adaptativa (BUCHHOLZ; SCHUMACHER; BUSCH, 2016).

Entretanto, a ativação eficiente dos linfócitos T dependem de sinais cognitivos e solúveis liberados por um conjunto de células da imunidade natural conhecidas como células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen presenting cells*), em especial as células dendríticas (DCs, do inglês *dendritic cells*) (SARKIZOVA; HACOEN, 2018). Quando comparada a outras células do sistema imune inato, as DCs apresentam biologia mais complexa (BONASIO; ANDRIAN, 2006; HUGUES *et al.*, 2006) e são divididas em duas subpopulações: plasmocitoides (pDC) ( $CD11c^+CD11b^+CD8\alpha^+$ ) e DCs mieloides (mDC) ( $CD11c^{high}CD11b^-CD8\alpha^-$ ), que inclui as DC derivadas de monócitos ( $CD14^+HLA-DR^+$ ), um subconjunto evolutivamente conservado de leucócitos que desempenham papéis chave na inflamação, representando cerca de 3 - 10% ( $300 - 900mm^3$ ) da totalidade de leucócitos na corrente sanguínea, diferenciando-se, também, em macrófagos (van FURTH, 1986; SWIRSKI *et al.*, 2010).

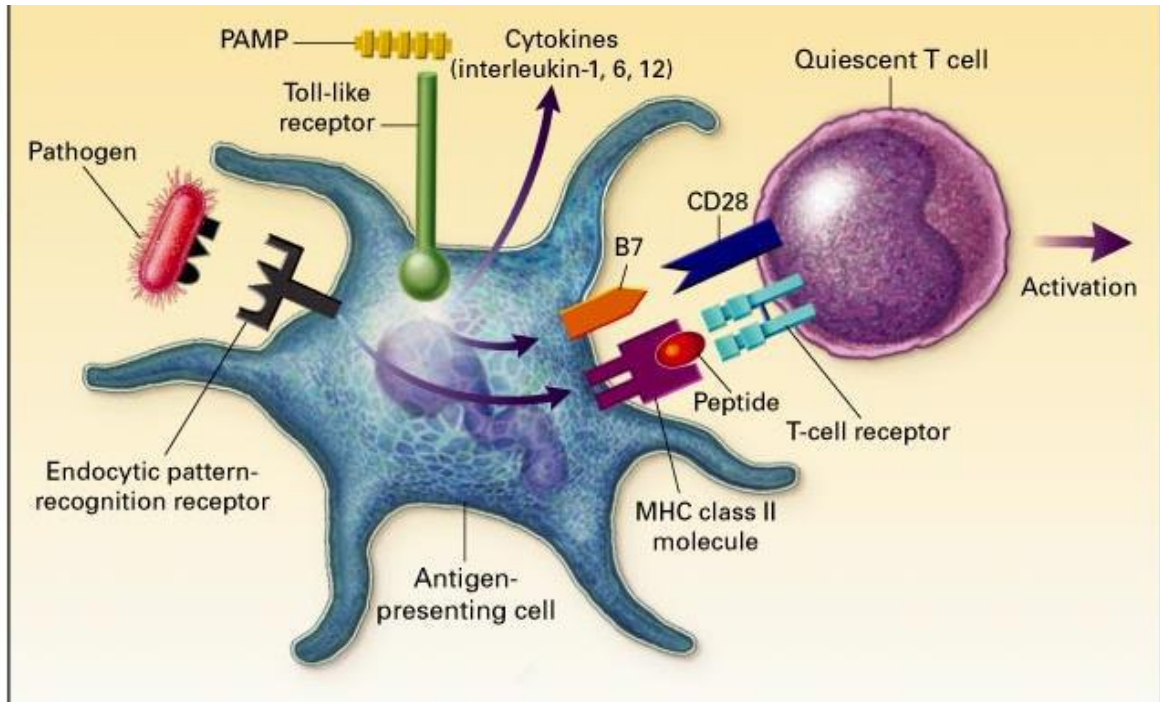
No entanto, independente de sua origem, as DCs imaturas possuem capacidade de internalizar e processar antígenos, mas apresentam pouca habilidade de ativar células T naive ( $T_N$ ). Todavia, ao reconhecerem diferentes agonistas dos

receptores do tipo Toll (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) ou citocinas inflamatórias (interleucina (IL)-1 $\beta$ , o fator  $\alpha$  de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  ou o interferon-gama (IFN- $\gamma$ )), essas células se tornam APCs eficientes, sendo então capazes de ativar células T<sub>N</sub> (Figura 1) (WATTS *et al.*, 2007).

A ativação das células T<sub>N</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) pelas DCs profissionais ocorre nos órgãos ou tecidos linfoides secundários nas áreas que concentram células T. Para tanto, as DCs maduras, que expressam CCR (do inglês, *C-C chemokine receptor*)-7, devem migrar para essas regiões em resposta às quimiocinas CCL (do inglês, *C-C Motif Chemokine Ligand*) 19/21. A ativação das células T pelas DCs envolve interações entre várias moléculas de adesão e coestimulatórias, fundamentais para estabilizar o contato intercelular (figura 1) (BACKER *et al.*, 2018).

Essa aproximação física permite que as células T, através de seus TCR (do inglês, *T-cell receptor*), possam identificar os complexos peptídeos:HLA (do inglês, *human leukocyte antigen*) na superfície das DCs. Caso essa interação seja de alta afinidade, vias de sinalização são disparadas em ambas células e há o aumento da avides relacionadas às interações moleculares estabelecidas na sinapse imunológica (CONNELL *et al.*, 2016).

Apesar de o reconhecimento dos peptídeos pelas células T ser uma etapa primária e fundamental da resposta imune, garantindo especificidade ao evento, este não é suficiente. A ativação e diferenciação eficazes das células T dependem, portanto, de um segundo sinal, que é antígeno-inespecífico e, principalmente, mediado pela interação da molécula CD28, expresso constitutivamente nos linfócitos T, com os seus ligantes, as moléculas B7.2 (CD86) e/ou B7.1 (CD80), presentes na superfície das DCs maduras (Figura 1). As vias de sinalização disparadas através do primeiro e segundo sinais são fundamentais para garantir a ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*), NF-AT (do inglês, *Nuclear factor of activated T-cells*) e complexo AP (do inglês, *Activator Protein*)-1 e 2, tal como a ação autócrina da IL-2, que induz a proliferação celular e potencializa a produção de outras citocinas pró-inflamatórias (HENRICKSON; ANDRIAN, 2007; DUSTIN *et al.*, 2009).



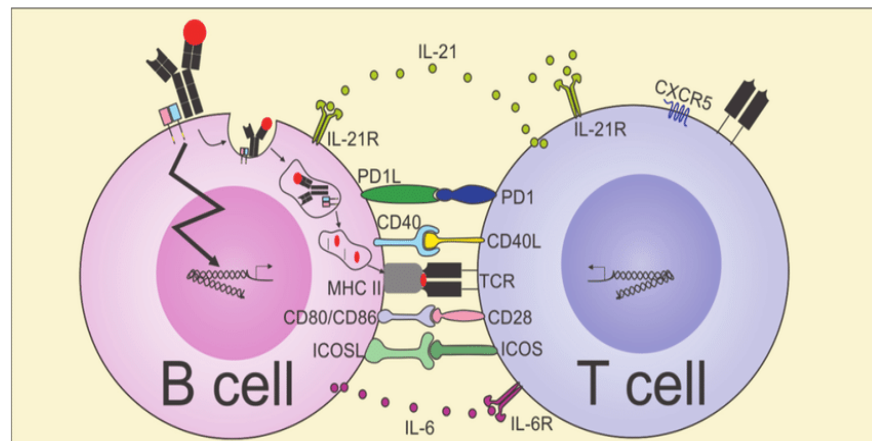
**Figura 1: Ativação dos Linfócitos T.** Durante o processo de ativação da resposta imune específica mediada pelas células T, as células dendríticas (DCs) profissionais apresentam diferentes peptídeos de proteínas antigênicas acoplados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Durante essa sinapse imunológica, moléculas coestimuladoras expressas na superfície das DCs, particularmente CD80 e CD86, interagem com o marcador CD28 expresso nas células T. Na figura os eventos imunes necessários para a ativação das células T CD4<sup>+</sup> estão sendo demonstrados. Fonte: Slideplayer.

### Linfócitos B como APCs

Após a formação na medula óssea, as células B maduras (CD19<sup>+</sup>) ocupam o conjunto de linfócitos circulantes e são encontradas nas regiões foliculares dos órgãos e tecidos linfoides secundários. Nesses locais, vão ser ativados, via BCR (do inglês, *B cell receptor*), por antígenos solúveis ou complexos imunes localizados na superfície de células dendríticas foliculares (FDC, do inglês *follicular dendritic cells*), que secretam BAFF (do inglês, *B-cell activating factor*) responsável pela sobrevivência e proliferação celular, e CXCL (do inglês, *chemokine C-X-C motif ligand*)-13 quimioatraente do receptor CXCR (do inglês, *C-X-C chemokine receptor*)-5, relacionado à entrada no folículo, localizado na superfície dessas células (SOUZA; BHATTACHARYA, 2019).

É descrito que o marcador CD83, quando presente na superfície de linfócitos B ativados, regulam positivamente a expressão do MHC (do inglês - *major histocompatibility complex*)-II e moléculas coestimulatórias, principalmente CD86 (REGINA *et al.*, 2017; WONG *et al.*, 2018).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, que expressam CXCR5 associados à baixa expressão de CCR7, migram para a região limite do folículo iniciando a interação entre as células T e B (SONG; CRAFT, 2019). Funcionalmente, esses linfócitos T, denominados T<sub>FH</sub> (do inglês, *T follicular helper*), produtores de IL-21 e positivos também para os marcadores PD (do inglês, *programmed cell death protein*)-1 e ICOS (do inglês, *inducible T-cell costimulator*), são imprescindíveis na resposta imune humoral por auxiliarem na proliferação, produção de anticorpos, mudança de classe e indução de memórias nas células B (HABERMAN *et al.*, 2019).



**Figura 2 Apresentação de antígenos pelos linfócitos B.** Após a diferenciação em células T helper folicular (T<sub>FH</sub>), esses linfócitos positivos para o marcador CXCR5 migram para aborda do folículo e interagem com linfócitos B, via MHC-II e moléculas coestimulatórias. Fonte The University of Turku, Faculty of Medicine, Institute of Biomedicine, Department of Medical Microbiology and Immunology, 2013.

### Diferenciação dos linfócitos T

Após a expansão clonal, faz-se necessário um terceiro sinal para a diferenciação das células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> ativadas, auxiliado principalmente por secreção de citocinas pelas DCs maduras, que conduzem à diversos fenótipos capazes de produzir diferentes padrões de citocinas, que irão regular e coordenar as respostas imunes (SARKIZOVA; HACOEN, 2018).

Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos via MHC-II e ajudam a coordenar respostas imunes estimulando outras células, como macrófagos, linfócitos B e linfócitos TCD8<sup>+</sup>. Nesse contexto, a citocina IL-12 secretada pelas mDCs e a ativação do fator de transcrição T-bet (do inglês, *T-box transcription factor*) induzem, nas células TCD4<sup>+</sup>, a diferenciação em células T auxiliares (Th, do inglês *T helper*) do tipo 1 (Figura 3A), responsável por produzir grandes quantidades de IL-2 e IFN- $\gamma$ ,

efetuar a resposta imune celular, fundamental no combate a microrganismos intracelulares obrigatórios ou facultativos, e aumentar a ativação de fagócitos, células assassinas naturais (células NK, do inglês *natural killer*) e dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (FAZILLEAU; MCHEYZER-WILLIAMS, 2007; HENRICKSON; ANDRIAN, 2007; HUSTER; STEMBERGER; BUSCH, 2006; ZHU; YAMANE; PAUL, 2012). O IFN- $\gamma$ , secretado pelas células T<sub>FH</sub> 1, também induz a produção e secreção de imunoglobulinas (Ig, do inglês *Immunoglobulin*) G1 e G3 pelos linfócitos B humanos (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010; SONG; CRAFT, 2019).

Na presença de níveis elevados de IL-4, as mDCs induzem a expressão do fator de transcrição GATA (do inglês, *trans-acting T-cell-specific transcription factor*)-3, importante na diferenciação dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> em células T auxiliares do tipo 2 (Th2) (figura 3A). Ao secretarem IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (VISEKRUNA; HUBER, 2014; ZHU; YAMANE; PAUL, 2012), as células Th2, com as células T<sub>FH</sub>2, coordenam a resposta imune atópicas e contra helmintos por ativar eosinófilos e induzir a produção de IgE (MAKANI; JEN; FINN, 2008; SONG; CRAFT, 2019; ZHU; YAMANE; PAUL, 2012).

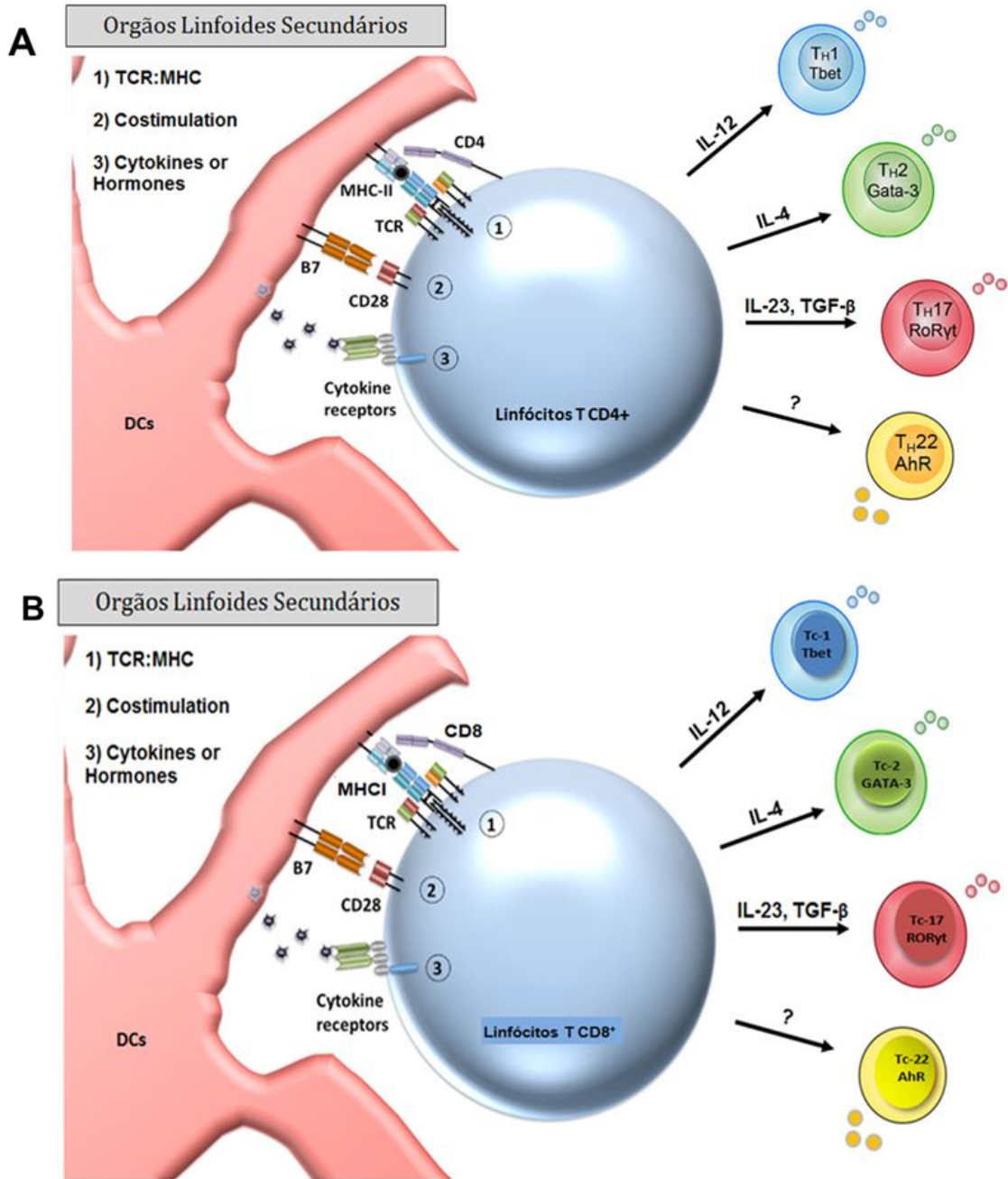
A ativação do fator de transcrição RORC (do inglês, *RAR-related orphan receptor C*), através da liberação de TGF- $\beta$  (do inglês, *transforming growth factor beta*) e IL-23 pelas mDCs, induz a diferenciação no fenótipo Th17 em humanos (Figura 3A) (MATSUZAKI; UMEMURA, 2007; OKUDA *et al.*, 2005). Os linfócitos Th17, quando ativados, sintetizam não apenas IL-17, mas também IL-21 e IL-22, que induzem as células imunes e parenquimatosas a secretarem IL-8, principal quimiocina envolvida no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção iniciada por bactérias extracelulares e fungos (CROZAT, 2009; MIOSSEC, 2009). Entretanto, no contexto de doenças autoimunes, novos estudos têm demonstrado o envolvimento de um subtipo de células Th17, conhecidas como células Th17 patogênicas, produtoras de IL-17 e INF- $\gamma$ , que parece ser induzida na presença de IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23, associada a ausência da citocina TGF- $\beta$  (LEE; KUCHROO, 2015; TAN *et al.*, 2014).

A célula T auxiliar 22 (Th22) (Figura 3A), um novo subtipo de células TCD4<sup>+</sup>, que possui como fator de transcrição o receptor hidrocarbono aril (AHR, do inglês *aryl hydrocarbon receptor*) (MIRSHAFIEY *et al.*, 2015), caracterizam-se por secretar altos níveis de IL-22 e têm sido implicadas em várias doenças autoimunes, tal como a psoríase e a EM (MIRSHAFIEY *et al.*, 2015; WING *et al.*, 2015).

A apresentação de peptídeos antigênicos acoplados às moléculas do MHC de classe I (MHC-I) expressos na superfície das APCs profissionais, particularmente das pDCs, ativam os linfócitos TCD8<sup>+</sup>, importantes no combate aos vírus. Quando ativadas, essas células se tornam linfócitos T citotóxicos (CTL, do inglês *cytotoxic T lymphocytes*), produzem granzimas e perforinas e são capazes de levar as células infectadas à apoptose, através da secreção coordenada desses produtos estocados em grânulos citoplasmáticos. Assim como os linfócitos TCD4<sup>+</sup>, essas células também são capazes de se diferenciar em fenótipos efetores distintos, secretando diferentes padrões de citocinas (VISEKRUNA; HUBER, 2014).

O perfil Tc-1 (do inglês, *T cytotoxic -1*) (Figura 3B) é diferenciado pela ação dos fatores Eomesodermina (Eomes), T-bet, Blimp-1 (do inglês, *PR domain zinc finger protein 1*) e Foxo 1 (do inglês, *Forkhead box protein O1*), secreta IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e são capazes de amplificar a resposta Th1. Semelhante ao linfócito Th2, os linfócitos T citotóxicos do tipo 2 (Tc-2) são diferenciados pela atuação do fator de transcrição GATA-3 e secretam as citocinas IL-4 e IL-5. E, por ação dos fatores de transcrição ROR $\gamma$ t (do inglês, *RAR-related orphan receptor gamma*), ROR $\alpha$  (do inglês, *RAR-4 related orphan receptor alpha*) e IRF4 (do inglês, *Interferon Regulatory Factor 4*) há o fenótipo Tc-17, secretores de IL-17 e IL-21 (OKUDA *et al.*, 2005; VISEKRUNA; HUBER, 2014).

Independente do fenótipo dos linfócitos T, a resolução da resposta imune específica é estabelecida pela memória imunológica.



**Figura 3: Diferenciação dos Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.** A indução de diferentes vias de sinalização que culminam na proliferação e diferenciação desses linfócitos em diferentes fenótipos que produzem um conjunto polarizado de citocinas pró-inflamatórias. Nesse contexto, enquanto a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> humanas no fenótipo Th1 e Tc-1, respectivamente, depende, principalmente, da produção de IL-12 pelas DCs maduras; a formação dos fenótipos Th2/Tc-2 e Th17/Tc17 é principalmente garantida quando elevadas concentrações de IL-4 e IL-23 mais TGF-β, respectivamente, são liberadas pelas DCs. Os linfócitos TCD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, capazes de produzir IL-22 – as células Th22/Tc22, cujo fator de transcrição é o receptor hidrocarbono aril (AHR).  
Fonte: Adaptado de Russ, B.A. et al., 2013 / O'Donnell, H. & McSorley, S.J., 2014 por SACRAMENTO, P.M.; MONTEIRO, C. & BENTO, C.A.M.



## Geração de memória

Inúmeras pesquisas foram e são realizadas com o objetivo de determinar como é gerada a memória imunológica, responsável por respostas rápidas e eficientes, importante frente a exposições subsequentes ao mesmo antígeno (BUCHHOLZ; SCHUMACHER; BUSCH, 2016; CHANG *et al.*, 2007; COBBOLD *et al.*, 2018).

Os primeiros estudos sobre o assunto discorrem sobre eventos estocásticos, ou seja, a definição de um estado específico ocorreria de forma aleatória (BUCHHOLZ; SCHUMACHER; BUSCH, 2016). Posteriormente, surgiu a teoria da divisão assimétrica, com sinalização desigual e dependente da sinapse imunológica. A divisão distal gera células menos ativadas e autorrenováveis, semelhantes as células T de memória central ( $T_{MC}$ ) e, as similares as células T de memória efetora ( $T_{ME}$ ), originadas pela divisão proximal (CHANG *et al.*, 2007).

Recentemente, Cobbold e colaboradores (2018) descobriam que o destino celular resulta de eventos arbitrários e dependem da expressão de GITR (do inglês, *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18* ou *glucocorticoid-induced TNFR-related protein*), receptor relacionado à ativação das células T, e desenvolvimento de uropódio (projeção da membrana celular, envolvida na migração ou ativação) que ocorre antes de qualquer divisão celular. As células efetoras ( $T_{ME}$ ) expressam GITR e desenvolvem uropódio em oposição as células de memória longa ( $T_{MC}$ ).

Um marco importante nos estudos de memória celular, foi conduzido por Sallusto (1999) e colaboradores, em que foi demonstrado a possibilidade de se identificar as células T de memória a partir de diferentes marcadores de superfície.

As células T de memória são encontradas por períodos longos após a exposição ao antígeno e são as remanescentes das duas fases da resposta imune: fase de expansão, em que as células  $T_N$  ( $CD45RA^+CCR7^+CD62L^+$ ) encontram o antígeno em órgãos ou tecidos linfoides secundários, e a fase de contração, caracterizada pela intensa morte apoptótica dos clones de células T efetoras hiperestimuladas, mas não mais necessárias. Na dependência de marcadores de superfície CD45RA, CCR7 e CD62L, tempo de sobrevivência e função efetora, as células T de memória são classificadas em dois grandes subtipos periféricos: as células T de memória efetora ( $T_{ME}$ ) e memória central ( $T_{MC}$ ) (BACKER *et al.*, 2018).



Enquanto as células  $T_{MC}$  (TORRI *et al.*, 2017) expressam o CCR7 e CD62L, mas não o CD45RA, as células  $T_{ME}$  são negativas para tríplice (WILLINGER *et al.*, 2020). No entanto, as duas populações celulares expressam a isoforma CD45RO, um membro da família de fosfatase capaz de acelerar a sinalização via TCR. Além dessas, uma terceira subpopulação de células T circulantes de vida longa foi descrita e denominada célula T de memória efetora terminalmente diferenciada ( $T_{EMRA}$ , do inglês *effector memory CD45RA+*) que possui alta expressão da molécula CD57, da molécula CD45RA, mas não de CCR7 e CD62L (LIPP *et al.*, 1999).

Além de expressar diferentes marcadores de superfície, as células T de memória possuem diferentes propriedades, a saber:

a) Células  $T_{MC}$  – possuem pouca função efetora de ação imediata, mas respondem muito bem à IL-2 e produzem altos níveis dessa citocina quando reestimuladas pelas APCs. Têm elevada resistência à morte apoptótica, o que lhe é garantido por sua habilidade em entrar nos órgãos linfoides secundários, onde recebem sinais de sobrevivência fornecidos pela IL-7 (células  $T_{CD4^+}$  e  $T_{CD8^+}$ ) e IL-15 (células  $T_{CD8^+}$ );

b) Células  $T_{ME}$  – possuem função efetora imediata e secretam citocinas relacionadas ao fenótipo diferenciado na resposta imune primária. Não possuem capacidade de migrar para os gânglios linfáticos, por não expressarem CCR7 e CD62L, e sua sobrevivência é relativamente curta e dependente da resposta inflamatória.

c) Células  $T_{EMRA}$  – São principalmente do tipo  $CD8^+$  e possuem potente função efetora, tais como a produção de granzimas e perforinas. Apesar de terem capacidade replicativa limitada, são altamente resistentes à morte por apoptose. Acredita-se que essas células tenham suas atividades reduzidas devido a expressão de marcadores de senescência imune, tais como CD57 associada a não expressão do marcador CD28 (OBAR; LEFRANÇOIS, 2011).

Inúmeros estudos demonstraram que o equilíbrio entre os diferentes subtipos de células T de memória depende da homeostase mantida particularmente por células reguladoras.

### **Regulação da resposta imune por células da imunidade adaptativa**

As respostas imunes necessitam ser reguladas com o objetivo de evitar o desenvolvimento de doenças imunomediadas. Sabe-se que as respostas Th1 e,

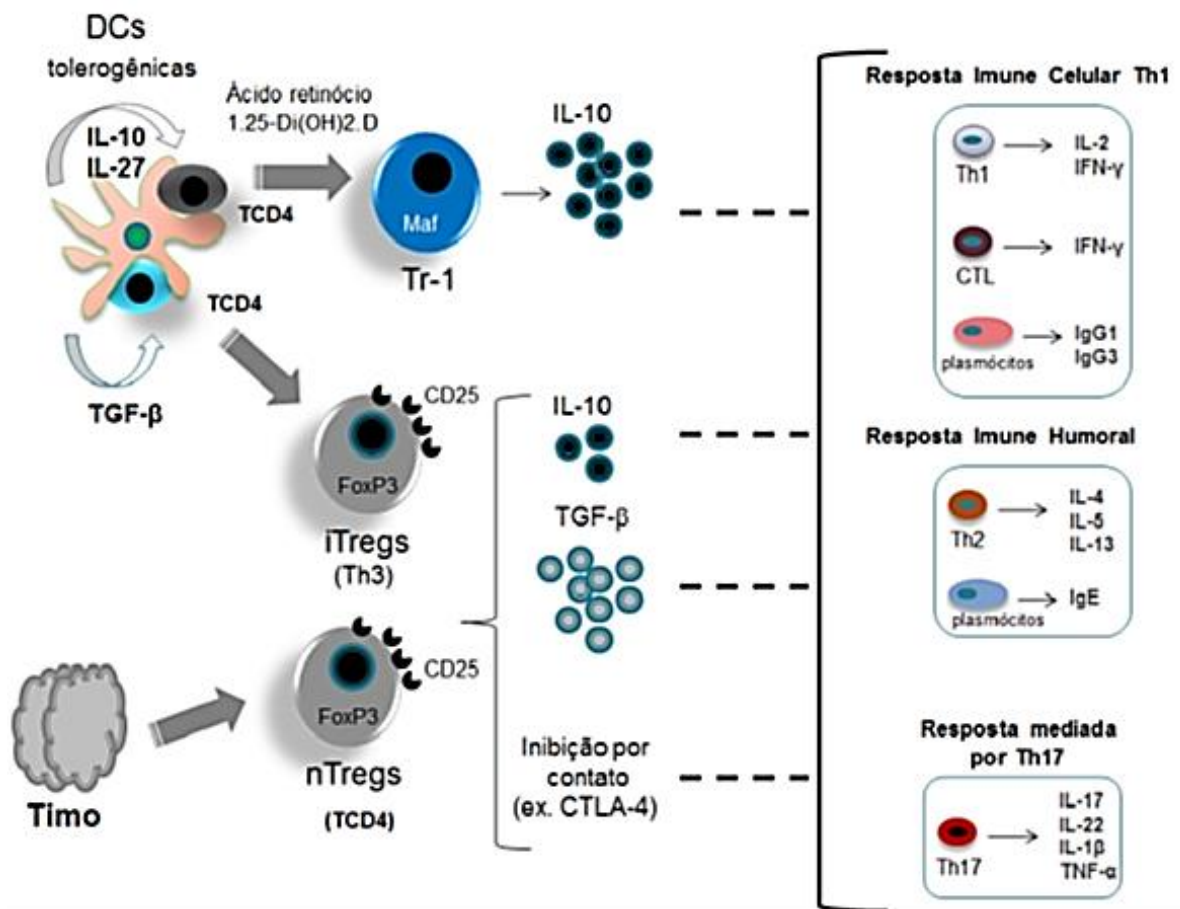
principalmente, Th17, quando exacerbadas, estão envolvidas no desenvolvimento de várias doenças autoimunes (ZAGHOUANI, 2010) e que as citocinas secretadas pelos linfócitos Th2 estão fortemente relacionadas às reações alérgicas mediadas pela IgE (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010).

Assim, os linfócitos T reguladores (Tregs) (Figura 4) são as células mais importantes na manutenção da homeostase e, portanto, do controle das respostas inflamatórias (VASILEIADIS *et al.*, 2018). Essas células podem ser naturalmente geradas no timo durante a ontogenia (nTreg), ou induzidas (iTreg e Tr-1) na periferia quando em contato com DC tolerogênicas (PHILLIPS *et al.*, 2019).

Fenotipicamente, as células nTreg e iTreg são, em sua maioria, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup>, capazes de inibir células T efetoras por contato ou através da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o TGF- $\beta$ . Por outro lado, as Tr-1 são FoxP3 negativas e inibem a resposta imune inflamatória pela liberação de grandes quantidades de IL-10 (MULS *et al.*, 2015).

Outras células também podem regular a resposta inflamatória. As células B reguladoras (Breg) atuam suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas DC. Por consequência, inibem a diferenciação dos perfis Th1 e Th17 (VASILEIADIS *et al.*, 2018) e favorecem a expansão dos linfócitos Treg (PIANCONE *et al.*, 2016). Alguns estudos em modelos animais demonstraram que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> produtores de IL-10 (TCD8<sup>+</sup> reg) possuem, também, papel imunossupressor, reduzindo a lesão tecidual causada após a infecção por Coronavírus (SINHA *et al.*, 2015; TRANDEM *et al.*, 2012).

Qualquer deficiência na função ou no número das células Tregs/Tr-1 e Breg, pode elevar o risco de doenças autoimunes, tal como a EM.



**Figura 4 As células T reguladoras e a homeostase imune.** Durante as respostas imunes inflamatórias, a produção excessiva de citocinas pelas células Th1 e Th17 patogênicas tem sido atrelada à distúrbios na rede de regulação, principalmente executada pelos linfócitos T reguladores (Tregs). As células Tregs representa uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup> relativamente heterogênea, sendo as células T CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> o subtipo mais estudado nas doenças autoimunes. Essas células podem ser tanto induzidas (iTregs) na periferia quando reconhecem os peptídeos específicos apresentados pelas células dendríticas (DCs) tolerogênicas, quanto geradas naturalmente no timo (nTregs). A terceira subpopulação é induzida por DCs tolerogênicas na presença do metabólito da vitamina D [1,25(OH)2D] ou do ácido retinóico. Essas células, conhecidas como células Tr-1, são negativas para o FoxP3 mas expressam elevados níveis do fator de transcrição Maf. Os mecanismos de ação executados pelas células para controlar reações inflamatórias são diversos e envolvem a inibição por contato com a célula alvo efetora (iTreg e nTregs) e/ou a liberação de citocinas anti-inflamatórias, particularmente IL-10 e TGF-β. Fonte: SACRAMENTO, P.M; MONTEIRO, C. & BENTO, C.A.M.

## ESCLEROSE MÚLTIPLA

### A doença

Em 1831, Robert Carswell e Jean Cruveilhier observaram a presença de placas em algumas necropsias, no SNC, sugestivos de uma nova doença. Já no final do século XIX, Jean Martin Charcot e Edmé Félix Alfred Vulpian descreveram, pela primeira vez, os aspectos físicos e patológicos da Esclerose Múltipla (EM) (SBN, 2020).

É uma doença inflamatória crônica, tendo como característica fisiopatológica principal a formação de placas desmielinizantes no SNC (composto pelo encéfalo e medula espinhal), o que representa o estágio final de vários processos patológicos, incluindo a quebra da barreira hematoencefálica (BHE), inflamação multifocal, desmielinização, remielinização, depleção de oligodendrócitos, gliose reativa e degeneração axonal e neuronal (SCOLDING *et al.*, 2015).

Revela grande variação de prevalência e incidência no mundo, apresentando aproximadamente 33 casos a cada 100 mil habitantes. No Brasil, há uma média de 8,69 casos por 100.000 habitantes, apresentando diferenças entre as regiões (1,36 casos no Nordeste a 27,2 casos no Sul e Sudeste) (KOBELT *et al.*, 2019), sendo mais comum em caucasianos e acomete, aproximadamente, 2 a 3 vezes mais mulheres em relação aos homens (ALVES- LEON *et al.*, 2008; ABEM, 2017; KOCH *et al.*, 2014).

A doença afeta principalmente pessoas com idade entre 20 e 50 anos, tendo um forte impacto na qualidade de vida, acarretando problemas familiares, sociais e profissionais (LEVIN *et al.*, 2014). Apesar de ser mais rara (aproximadamente 5% dos pacientes), a EM pode ocorrer durante a infância ou na adolescência e após os 60 anos (SUPPIEJ; CAINELLI, 2014).

É considerada uma das doenças neurológicas mais comuns, mas com causa ainda desconhecida (ABN, 2020). Vários estudos sugerem que o desenvolvimento e progressão da EM esteja relacionada a interações complexas entre fatores genéticos e ambientais que desencadeiam os mecanismos de autoagressão (DOLEI *et al.*, 2019).

Os genes mais implicados na susceptibilidade à EM são os alelos dos antígenos leucocitários humanos (HLA) DR15\*1501, DRB5\*0101, DQA1\*0102

DQB1\*0602, situados no cromossomo 6 (DYMENT; EBERS; SADOVNICK, 2004). Já os fatores de riscos ambientais mais associados à doença são: baixos níveis de vitamina D, infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV), tabagismo e disbiose (AHMED *et al.*, 2019; ILLIANO; BRAMBILLA; PAROLINI, 2020).

Alguns autores apontam a reativação, principalmente pela influência dos fatores ambientais citados, dos retrovírus endógeno humano (HERV, do inglês *human endogenous retroviruses*) como gatilho para doença (GRUCHOT; KREMER; KÜRY, 2019; LUCA *et al.*, 2019). Esses HERVs incorporaram-se ao genoma humano há mais de 100 mil anos, foram neutralizados por metilação e fixados na população através da deriva genética (MORANDI; TANASESCU; TARLINTON, 2019).

Devido a sua heterogeneidade, o espectro de sintomas da EM é muito variado, mas o paciente comumente se queixa de fadiga intensa, depressão, fraqueza muscular, alteração do equilíbrio da coordenação motora, dores articulares e neurite óptica (DECKX *et al.*, 2013).

As Academias Americana e Brasileira de Neurologia propuseram a classificação de doenças desmielinizantes inflamatória, de acordo com a sua gravidade e tipo de evolução clínica. As primeiras apresentações da doença podem ser a Síndrome Radiológica Isolada (RIS, do inglês *Radiologically Isolated Syndrome*) que é pré-clínica e diagnosticada a partir de padrões alterados nas imagens de ressonância magnética sugestiva de EM (desmielinização e inflamação no parênquima cerebral), mas sem sinais nem sintomas clínicos, e a Síndrome Clínica Isolada (CIS – do inglês *Clinically Isolated Syndrome*), primeiro episódio clínico da doença, com duração de, pelo menos, 24h e se apresenta com desmielinização compatível com EM, subdividida em baixo e alto risco de conversão para a forma ativa da doença (AAN, 2017; MATUTE-BLANCH *et al.*, 2017; ABN, 2018).

Após o diagnóstico definitivo, a maioria dos pacientes (80 a 85%) evolui para a forma remitente-recorrente (EMRR), caracterizada pela ocorrência de episódios agudos (surtos) de comprometimento neurológico (CHAIRMAN *et al.*, 1960; FILIPPI *et al.*, 2018). Ao longo dos anos, e por motivos ainda desconhecidos, a maioria desses pacientes progride para a forma secundária progressiva (EMSP), que é neurodegenerativa e refratária ao tratamento com as drogas atualmente disponíveis. Aproximadamente 50% dos casos de EMRR convertem para esta forma após 10 anos do diagnóstico (MAHAD; TRAPP; LASSMANN, 2015).

Sendo menos frequente, a forma Primária Progressiva (EMPP) (acometendo 5% dos pacientes) caracteriza-se por um curso progressivo, com velocidade variável, logo após a primeira manifestação da doença (DECKX *et al.*, 2013) e, recentemente, foi disponibilizado o tratamento para essa condição (ANVISA, 2018).

Em 2009, foi introduzido o conceito de ausência de atividade da doença (NEDA, do inglês *no evidence of disease activity*) ou mínima atividade da doença (MEDA, do inglês *minimal evidence of disease activity*) determinando o estado daqueles pacientes sem ou mínimo surtos e progressões clínicas e radiológicas (GIOVANNONI, 2018). Os fenótipos EMRR e EMSP podem ser estratificados pela presença ou não de atividade da doença e os fenótipos progressivos são definidos pela progressão contínua, avaliada anualmente (ABN, BCTRIMS, 2018).

Portanto, o curso da EM pode ser considerado a expressão de dois fenômenos clínicos: surtos agudos, com ocorrência, recorrência ou agravamento de sintomas neurológicos com duração igual ou superior a 24h, que terminam com remissão parcial ou completa, e progressão, que se refere à piora irreversível dos sinais e sintomas por um período igual ou superior a 6 meses. Existe forte evidência de que os surtos sejam principalmente a expressão de inflamação aguda, focal, disseminada (no tempo e espaço) e recorrente no SNC (MARQUES *et al.*, 2018).

Na EMRR os surtos refletem o processo inflamatório focal, coordenado pelas células T dirigidas contra proteínas da bainha de mielina no SNC, levando ao aparecimento de várias lesões desmielinizantes. Quando se esgotam a capacidade dos processos adaptativos e reparadores do SNC, envolvidos na remielinização e a recuperação axonal na fase de remissão, o paciente entra na forma progressiva (FILIPPI *et al.*, 2018).

Nos pacientes, o grau de comprometimento neurológico é comumente estadiado de acordo com a avaliação dos Sistemas Funcionais (FS – do inglês *functional systems*) (Quadro 1) por meio da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês *Expanded Disability Status Scale*) (Figura 5) (KURTZKE, 1983). A escala possui vinte itens com pontuações que variam de 0 a 10, que aumentam meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente. O maior enfoque dado é a capacidade de deambulação, principalmente se o EDSS for maior que 4. Nessa escala, 0 indica paciente sem déficit neurológico enquanto que 10 indica morte em decorrência da EM, sendo esse evento muito raro (GAFSON; GIOVANNONI; HAWKES, 2012).

**Quadro 1 Os sistemas funcionais avaliados no âmbito da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês Expanded Disability Status Scale)**

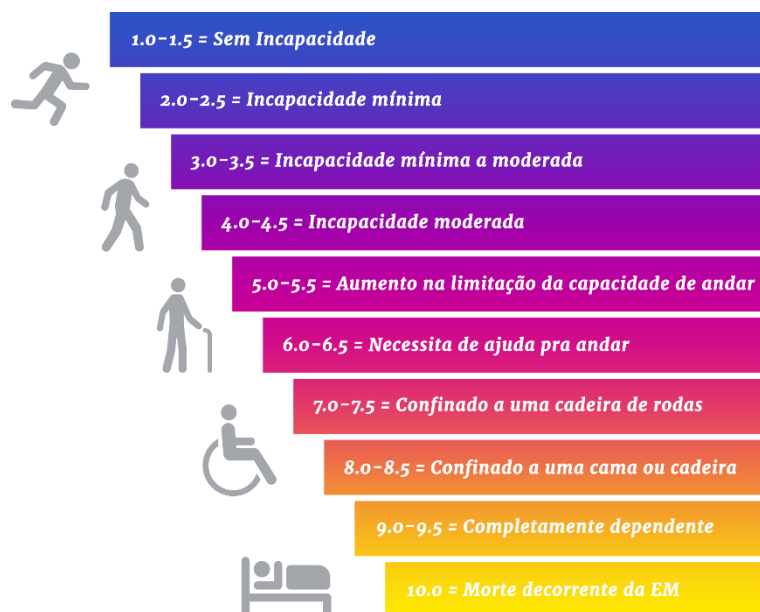
<ul style="list-style-type: none"><li>✓ Funções Piramidais</li><li>✓ Funções cerebelares</li><li>✓ Funções do tronco cerebral</li><li>✓ Funções sensitivas</li><li>✓ Funções vesicais</li><li>✓ Funções intestinais</li><li>✓ Funções visuais</li><li>✓ Funções mentais</li><li>✓ Outras funções</li></ul>
--

Fonte: Ministério da Saúde, 2015

### **Imunopatologia**

As lesões desmielinizantes são o resultado de processo inflamatório centrado, principalmente, nos nervos ópticos e medula espinhal, com participação ativa de vários componentes do sistema imune inato e adaptativo (COURTEN; MATSOUKAS; APOSTOLOPOULOS, 2017).

Os linfócitos T autorreativos ativados na periferia acessam o SNC através de alterações na permeabilidade da BHE. No parênquima cerebral, esses linfócitos são reestimulados e atacam a bainha de mielina através do reconhecimento de peptídeos das proteínas básica de mielina (MBP, do inglês *myelin basic protein*), neurofasceínas,  $\alpha\beta$ -cristalina e glicoproteína de oligodendrócito da mielina (MOG, do inglês, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Essas células efectoras iniciam um processo inflamatório através da liberação de diferentes citocinas e o recrutamento de outras células inflamatórias periféricas, tais como monócitos e os linfócitos B produtores de anticorpos antimielina (SONG. *et al.*, 2014). A ativação dos monócitos, astrócitos e micróglia pelas citocinas liberadas pelas células T efectoras podem, adicionalmente, causar dano à bainha da mielina através da liberação de radicais livres derivados e metaloproteínases (MMP – do inglês *matrix metalloproteinases*) (ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2012).



**Figura 5 Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke.** Método para quantificar o grau de incapacidade na esclerose múltipla. A escala classifica a incapacidade em sistemas funcionais (SF) e permite aos neurologistas determinar uma pontuação a cada um deles. Fonte: Sanofi®

Com relação ao fenótipo, vários estudos têm demonstrado uma relação entre a frequência de células Th1 e Th17 produtoras de IFN- $\gamma$  na patogênese da EM. Uma elevada frequência de células T CD4<sup>+</sup> capazes de produzir IFN- $\gamma$  foi detectada no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com EM durante os surtos clínicos (TABARKIEWICZ, 2015). Adicionalmente, a expressão de IL-17 foi observada nas áreas de lesão cerebral ativa, levando ao aumento de astrócitos neurotóxicos e apoptose dos oligodendrócitos (POTENTIAL; LIDDELOW; BARRES, 2017).

Por outro lado, a IL-22 parece induzir a morte apoptótica dos oligodendrócitos através da via envolvendo Fas/FasL. Os níveis de IFN- $\gamma$ , importante citocina produzida majoritariamente pelas células Th1 e TCD8<sup>+</sup>, também foram detectados no sangue periférico de pacientes durante as recaídas clínicas de incapacidade neurológica e também tem sido associado à apoptose dos oligodendrócitos (VISEKRUNA; HUBER, 2014).

Rasouli e colaboradores (2016) demonstraram elevada frequência, na EM, de células Th1 e Th17 encefalitogênicas capazes de produzir simultaneamente GM-CSF (do inglês, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), um fator hematopoiético estimulador de colônia para granulócito e macrófago. Acredita-se que esse fator amplifique os mecanismos de lesão neuronal por favorecer o



recrutamento e a ativação dos monócitos (CODARRI *et al.*, 2011; PONOMAREV *et al.*, 2007; RASOULI *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que as células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, capazes de produzir IFN- $\gamma$  (Tc-1) ou IL-17 (Tc-17), predominam nas lesões desmielinizantes, independente do estágio da doença, e são capazes de reconhecer e destruir de forma direta os oligodendrócitos através da liberação de granzimas e perforinas (BJARTMAR; WUJEK; TRAPP, 2003; SKULINA *et al.*, 2004).

Quanto aos linfócitos B, o interesse surgiu após pesquisadores demonstrarem benefício da imunoterapia com anticorpos monoclonais anti-CD20, que depletam essas células e atenuavam as lesões decorrentes da inflamação (NEGRON *et al.*, 2019). Outra observação importante é a presença de anticorpos patogênicos, numa fase mais tardia, persistindo mesmo após a inflamação veiculada pelos linfócitos B e T ter desaparecido, o que explica a persistência de bandas oligoclonais (BOCs) no LCR ao longo de várias fases da doença e pode prever a conversão da síndrome clínica isolada para a EM clinicamente definida (DISANTO, 2012; MIYAZAKI *et al.*, 2014; PIANCONE *et al.*, 2016).

Assim como em outras doenças autoimunes, deficiências no compartimento das células Tregs têm sido descritas em pacientes com EM (MULS *et al.*, 2015). Apesar da maioria dos estudos não ter conseguido identificar uma diferença significativa na frequência de células Tregs no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes, outros revelam, no entanto, a incapacidade dessas células em inibir a proliferação e a produção de citocinas inflamatórias pelas células T efetoras específicas para proteínas da mielina (MICHEL *et al.*, 2008; VENKEN *et al.*, 2008).

Essa deficiência funcional pode estar relacionada à menor expressão intracelular, nas células Treg, da proteína FoxP3 em pacientes com EM. Além do mais, durante as recaídas clínicas, linfócitos T FoxP3<sup>+</sup> representam o infiltrado minoritário, dentre os leucócitos, no cérebro de pacientes. A menor frequência dessas células no SNC, durante o surto, pode indicar falha em migrar para as áreas de lesão devido a não expressão de adressinas específicas, reduzida sobrevivência local ou mesmo transformação dessas em células potencialmente encefalitogênicas do fenótipo Th17 (VENKEN *et al.*, 2007).

De modo interessante, estudo por Michel e colaboradores (2008) sugere que falhas funcionais das células Tregs em controlar a reação inflamatória em pacientes

com EM sejam indiretas, isto é, estejam relacionadas à elevada produção de citocinas inflamatórias, tais como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , produzidas por linfócitos T efetores que expressam elevados níveis do receptor para a citocina IL- 7, o CD127. Nesse estudo, a depleção *in vitro* dessas células CD4<sup>+</sup>CD127<sup>++</sup> permitiu que os linfócitos Tregs dos pacientes fossem igualmente capazes, quando comparado a indivíduos saudáveis, de inibir a resposta inflamatória mediada por células T efetoras. Esses resultados sugerem que, na verdade, deficiências nos mecanismos de regulação possam estar atreladas à elevada produção de citocinas inflamatórias durante as recaídas clínicas, e que não há defeitos intrínsecos nos programas genéticos de indução e manutenção dessas células Tregs (DA COSTA *et al.*, 2016; MICHEL *et al.*, 2008; MULS *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o tratamento da EM com drogas que reduzem o estado inflamatório do paciente podem auxiliar na recuperação funcional das células reguladoras em questão.

### **Tratamento**

A EM é uma doença de caráter crônico que, atualmente, não tem cura. Porém, existem estratégias que buscam reduzir a atividade inflamatória, conversão entre os fenótipos, surtos e progressão ao longo dos anos, contribuindo para a redução do acúmulo de incapacidade durante a vida do paciente (DARGAHI *et al.*, 2017; BCTRIMS, 2018).

Dentre esses agentes, podemos destacar os corticoides, utilizados para controlar as crises agudas de incapacidade neurológica, e as terapias modificadoras de doença (TMD), administradas no período de remissão da doença e que têm como objetivo maior prevenir a ocorrência de novas atividades clínicas e radiológicas, reduzindo o risco e a gravidade das recaídas (SCOLDING *et al.*, 2015).

Alguns autores apontam a forma CIS como “janela” oportuna, nos dois primeiros anos e diagnóstico, para que o tratamento seja eficaz, minimizando as chances de conversão para fenótipos mais agressivos (PAOLICELLI *et al.*, 2020). A presença de BOCs, neurofilamento de cadeia leve (NfL, do inglês *neurofilament light chain*), de proteína 1 semelhante à actinase-3 (CHI3L1, do inglês *Chitinase 3-like 1*) e o aumento da expressão de HERVs no LCR podem predizer a evolução da doença

(DOLEI *et al.*, 2019; MATUTE-BLANCH *et al.*, 2018). Porém, o início terapêutico se dá, por enquanto, após a confirmação da forma clínica remitente recorrente.

A escolha do tratamento deve ser individualizada, levando-se em consideração a tolerância do paciente aos eventos adversos (COMINI-FROTA *et al.*, 2017). No Brasil, o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) do Ministério da Saúde é baseado em regras burocráticas e farmacoeconômicas. É, portanto, inflexível e não leva em conta os avanços no conhecimento por não considerar a complexidade e a heterogeneidade individual da doença e do tratamento (BCTRIMS, 2018). Embora o protocolo atenda às necessidades regulatórias do Estado, ele restringe o tratamento que seria mais apropriado para cada paciente e, portanto, representa um atraso na terapêutica da EM (COMINI-FROTA *et al.*, 2017).

Após intensa revisão das TMD pelo Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisas em Esclerose Múltipla e o Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia, ficou estabelecido que o Interferon (IFN- $\beta$  1a e 1b), o Acetato de Glatirâmer, a Teriflunomida e a Cladribina são boas alternativas para uso em pacientes com alto risco de conversão da forma CIS para EMRR. Acrescenta-se a esse grupo de fármacos o IFN- $\beta$  peguilado e DMF, para tratamento de pacientes em remissão com baixa ou moderada atividade da doença. Para a alta atividade é administrada Alemtuzumabe, Cladribina, FGL, Natalizumabe ou Ocrelizumabe, sendo este administrado em pacientes com a forma primária progressiva.

O tempo de tratamento ou a troca de medicamento são determinados pela falha terapêutica ou pelo surgimento de efeitos adversos intoleráveis, após considerar todas as medidas para sua atenuação. Considera-se falha terapêutica dois ou mais surtos num período de 12 meses, de caráter moderado ou grave (com sequelas ou limitações significantes, pouco responsivas à pulsoterapia) ou evolução do EDSS em 1 ponto, ou progressão significativa de lesões em atividade da doença (DARGAHI *et al.*, 2017).

O Transplante Autólogo de Células Tronco Hematopoiéticas, a Mitoxantrona, a Ciclofosfamida e o Rituximabe podem ser usados, apesar de não serem formalmente aprovados pela ANVISA (COMINI-FROTA *et al.*, 2017; BCTRIMS, 2018).

## Fármacos aprovados para administração

Os IFN- $\beta$  são um grupo de glicoproteínas endógenas com propriedades imunomoduladoras, antivirais e antiproliferativas (GREENBERG *et al.*, 2013). O fármaco compartilha a mesma sequência de aminoácidos observado no IFN- $\beta$  humano e atua antagonizando a síntese do IFN- $\gamma$ , importante citocina envolvida no aumento da expressão de MHC-II e moléculas neurotóxicas pelos macrófagos e micróglia capazes de danificar os oligodendrócitos (MICHEL *et al.*, 2015). Em relação ao Interferon- $\beta$ 1a peguillado, o mecanismo de ação é semelhante ao fármaco convencional, porém o efeito é prolongado devido a conjugação covalente do IFN- $\beta$ 1a ao polietilenoglicol (PEG) (ORTIZ *et al.*, 2018).

Alguns estudos *in vitro* sugerem que o acetato de glatirâmer estabeleça uma competição pelas moléculas MHC-II, diminuindo a oferta de MBP, MOG e da proteína proteolipídica (PLP, do inglês *proteolipid protein*) que são apresentados às células T CD4<sup>+</sup> mielina-específicas (COMI *et al.*, 2011; TSELIS, 2007).

O Natalizumabe é um inibidor seletivo de moléculas de adesão e atua ligando-se à subunidade  $\alpha$ 4 das integrinas  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 e  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, que são expressas na superfície de todos os leucócitos, com exceção dos neutrófilos, inibindo a adesão mediada por  $\alpha$ 4 aos seus contrarreceptores (RICE; HARTUNG; CALABRESI, 2005). Os receptores da família  $\alpha$ 4 de integrinas incluem a molécula-1 de adesão às células vasculares (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion protein 1*), que é expressa no endotélio vascular ativado. A perturbação destas interações moleculares previne a transmigração dos leucócitos mononucleares através do endotélio para o tecido parenquimal inflamado. Este fármaco está fortemente associado ao risco aumentado de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP) causada pelo vírus JC (John Cunningham) (MICHEL *et al.*, 2015).

Os anticorpos monoclonais Alemtuzumabe (dirigido contra a molécula CD52, presente na superfície da maioria dos leucócitos maduros, excetuando os neutrófilos) e Ocrelizumabe (depleta, seletivamente, linfócitos positivos para a molécula CD20), levam à apoptose mediada pelo sistema complemento (FRAU *et al.*, 2019; GELFAND; CREE; HAUSER, 2017; GRAF *et al.*, 2019).

Todas as drogas citadas previamente são injetáveis e o surgimento de fármacos orais trouxe uma nova perspectiva para o tratamento por ser indolor e pela praticidade da administração. Nessa categoria estão a cladribina, que atua

induzindo os linfócitos T e B à apoptose (COMI *et al.*, 2019; COOK *et al.*, 2019), a teriflunomida, que bloqueia a divisão celular (LAPLAUD *et al.*, 2019), DMF e FGL.

### Dimetilfumarato

A resposta farmacodinâmica parece ser mediada, principalmente, pela oxidação da proteína Keap-1 (do inglês, *Kelch-like ECH protein 1*) e ativação do Fator Nuclear tipo 2 (Nrf2, do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), importante fator de transcrição regulador da expressão de enzimas protetoras que se ligam ao elemento de respostas antioxidantes (ARE, do inglês, *antioxidant response element*). A exposição a agentes citotóxicos, como espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) ativa a via Nrf2-ARE e atenuam o processo inflamatório e danos decorrentes deste, principalmente por diminuir a frequência de linfócitos T<sub>ME</sub> e promover resistência à neurotoxicidade (ALBRECHT *et al.*, 2012; WU\* *et al.*, 2018).

### Fingolimode

Primeiro fármaco oral a receber aprovação para o tratamento da EM, foi desenvolvido a partir da miriocina, uma substância produzida pelo fungo *Isaria sinclairii*, e possui uma estrutura química semelhante à esfingosina, sendo o primeiro de uma nova classe de fármacos que atuam nos receptores da esfingosina fosfato (SERPERO *et al.*, 2013).

A esfingosina é um produto da degradação da esfingomielina, encontrada nas membranas celulares (SOLIVEN, 2011). Todas as células, durante o processo de renovação dos esfingolipídios, são capazes de gerar esfingosina intracelular que é, em seguida, fosforilada através das esfingosinas-quinases 1 e 2 (ShpK-1 e 2) em esfingosina -1-fosfato (S1P - do inglês *Sphingosine-1-phosphate*), a forma biológica ativa (GRÄLER & GOETZL, 2004).

No adulto existe um gradiente significativo de concentração de S1P entre o plasma (mais concentrada) e os tecidos, o que parece ser essencial para a manutenção do direcionamento das células imunitárias entre ambos, do tônus vascular e das barreiras endoteliais e a comunicação entre as conexinas Cx43 e CX56 nas células do SNC (SCHULZE *et al.* 2011). No plasma, é produzida pelos

eritrócitos e plaquetas e circula ligada à albumina e às lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoprotein*). O aumento da produção de S1P ocorre também em locais de inflamação, em resposta à ativação celular por mediadores pró-inflamatórios, incluindo IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e o fator de crescimento vascular do endotélio (VEGF – do inglês *vascular endothelial growth factor*) (GRÄLER & GOETZL, 2004).

A S1P liga-se a cinco receptores aderidos à proteína G (MENG; LEE, 2009), S1P1 a S1P5. O receptor S1P1, 2 e 3 são expressos em células do sistema imune (DUSABAN *et al.*, 2017), cardiovascular e nervoso central, enquanto o receptor S1P4 é expresso somente em tecidos linfoides (SCHULZE *et al.*, 2011) e o S1P5 está presente no baço e na substância branca do SNC, predominando nos oligodendrócitos (SOLIVEN; MIRON; CHUN, 2011).

A forma estruturalmente análoga ao S1P, o fingolimode, após a absorção, é fosforilado pela SphK-2, principalmente pelas plaquetas, para originar a forma biologicamente ativa: fingolimode-S-fosfato (MIZUGISHI *et al.*, 2005). Este, é exportado da célula por transportadores pertencentes à família de cassetes de ligação ao ATP para atuar nos receptores de membrana (SERPERO *et al.*, 2013).

Em pacientes com EM, o FGL afeta a recirculação de células T, promovendo uma redução seletiva de células T<sub>N</sub> e T<sub>MC</sub> (que expressam o receptor CCR7) aprisionando-as nos linfonodos em detrimento das células T<sub>ME</sub>, que permanecem na periferia (MEHLING; RAULF, 2010).

As células T<sub>ME</sub> são importantes para a imunidade protetora e, após interação de alta intensidade com antígenos, respondem de forma rápida, migrando, preferencialmente, para áreas inflamadas na periferia, com ação efetora imediata. Deste modo, possuem menor dependência de S1P para sair dos linfonodos, por não precisarem ultrapassar os sinais de retenção determinados por CCR7 (INGWERSEN *et al.*, 2012).

As células T<sub>MC</sub>, em oposição às T<sub>ME</sub>, são induzidas na sequência de estímulos de baixa intensidade ou curta duração e caracterizam-se por manterem a expressão de CCR7 e, em resposta, migram para os linfonodos, onde aguardam nova estimulação para adquirir propriedades efetoras (MICHEL; LAROCHELLE; PRAT, 2015).

A ação do FGL em sequestrar preferencialmente T<sub>MC</sub> é relevante na EM, já que esse subtipo celular produtor de INF- $\gamma$  e IL-17 migra com mais avidéz através

da BHE e estão acumulados no LCR, enquanto as T<sub>ME</sub> estão praticamente ausentes (MEHLING; RAULF, 2010; QUIRANT-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

### Outras opções terapêuticas

O uso de drogas citotóxicas amplamente empregadas no tratamento de neoplasias (mitoxantrona e ciclofosfamida) podem interferir com o ciclo celular. Esses fármacos são potentes imunossupressores tanto da imunidade celular quanto humoral (MARTINELLI *et al.*, 2009). A administração de imunoglobulina intravenosa induz autofagia, principalmente em células inflamatórias como monócitos clássicos, DCs e macrófagos M1 (DAS *et al.*, 2020). O rituximabe é um anticorpo monoclonal dirigido contra a molécula CD20, na superfície dos linfócitos, levando-os à apoptose (SELLNER *et al.*, 2019).

Outra estratégia que tem se mostrado promissora, mas controversa, na medicina regenerativa, é o transplante de células hematopoiéticas (HSCT, do inglês *hematopoietic stem cell transplantation*) (VAN WIJMEERSCH *et al.*, 2008). Esse transplante pode ser útil para melhorar a função neurológica de pacientes com EM, uma vez que substitui células autorreativas por células saudáveis (WOGNUM; EAVES; THOMAS, 2003). Estudos têm mostrado que essa terapia impediu a ocorrência de novos surtos e o desenvolvimento de novas lesões num período de 5 a 7 anos (ATKINS *et al.*, 2016; BAKHURAYSAH; SIATSKAS; PETRATOS, 2016).

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 – Geral

Comparar o impacto das terapias orais, dimetilfumarato (DMF) e fingolimode (FGL), na frequência de diferentes subtipos de células T, células B e monócitos circulantes em pacientes com EMRR.

### 1.2 – Específicos

- Determinar o impacto DMF e FGL nas células  $T_N$ ,  $T_{ME}$ ,  $T_{MC}$  e  $T_{EMRA}$ ;
- Comparar o impacto da infecção pelo HIV-1, em pacientes sem EM, e da terapia com FGL sobre as células  $T_N$ ,  $T_{ME}$ ,  $T_{MC}$  e  $T_{EMRA}$  circulantes;
- Investigar se o DMF e FGL modulam a proporção de células T circulantes que expressão CD28 e CD57;
- Avaliar a capacidade do DMF e do FGL em alterar proporção das células  $T_N$ ,  $T_{ME}$ ,  $T_{MC}$  e  $T_{EMRA}$  capazes de produzir IFN- $\gamma$ ;
- Identificar a proporção de monócitos, em pacientes com EMRR, capazes de expressar CD80 e CD86 sob terapia com DMF ou FGL;
- Investigar se o DMF e o FGL alteram a proporção de diferentes subtipos de linfócitos B em pacientes com EMRR com base na expressão de CD86, CD83 e CD11c;
- Comparar a porcentagem dos diferentes subtipos celulares com o grau de incapacidade neurológica.



## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 - Pacientes**

Para o estudo, 38 pacientes diagnosticados com Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (EMRR), em remissão, foram recrutados do ambulatório de neurologia do Hospital Gaffrée e Guinle (HUGG)/UNIRIO. Os pacientes foram subdivididos em três grupos: sem tratamento (n=11); tratados com dimetilfumarato (n=17) ou com fingolimode (n=10). Como controle, 14 indivíduos saudáveis foram recrutados. Dez pacientes soropositivos para HIV-1 foram recrutados do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, sem tratamento com terapias antirretrovirais. Como controle, 10 indivíduos saudáveis foram recrutados. Os critérios de exclusão foram: portadores de quaisquer outras doenças autoimunes e neoplasias, gestante, tabagistas ou usuários de substâncias ilícitas.

Vale ressaltar que o estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HUGG/UNIRIO (Anexo 1), e as amostras só foram colhidas após cada participante ter dado seu consentimento oral e por escrito, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

### **2.2 – Obtenção e estimulação das células do sangue periférico**

Foram colhidas 5 mL de amostras de sangue periférico de todos os indivíduos recrutados para o estudo através da utilização de agulhas e tubo estéreis contendo heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY).

Para o estudo das células T, alíquotas de 500 µL do sangue periférico foram mantidas em placas de 48 poços de fundo chato, na ausência (poços controles) e na presença de acetato miristato de forbol (PMA; Sigma-Aldrich) a 20 ng/mL e Ionomicina (IO; Sigma-Aldrich) a 600 ng/mL (poços ativados). Para otimizar a marcação intracelular de citocinas, todas as amostras foram mantidas na presença de brefeldina A (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas por 3 horas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Alíquotas de 200µL foram inseridas em microtubos para análise de marcadores de superfície celular.

### **2.3 – Análise fenotípica por Citometria de Fluxo**

Para identificar diferentes fenótipos de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, as amostras, ativadas ou não, foram submetidas à citometria de fluxo após marcação com

diferentes combinações de anticorpos monoclonais (mAbs) fluoresceïnados (BioLegend, San Diego, CA, USA).

Para tal, 3 horas após incubação, 200 µL das amostras de sangue foram marcadas com anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD197(CCR7)-PE, anti-CD4-FITC, anti-CD8-FITC, anti-CD45RA-PE-Cy7 e anti-CD62L-APC, por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Terminado o tempo de incubação, a suspensão celular foi submetida tanto à lise das hemácias quanto à fixação através da incubação do sangue total com solução de lise/fixação (eBioscience) por 15 minutos, sob proteção da luz. As células foram lavadas duas vezes com solução de PBS suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e permeabilizadas, utilizando a solução Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmigen, San Diego, CA) à temperatura ambiente por 20 minutos, sob proteção da luz.

Para determinar a frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$ , as células foram lavadas (PBS com 1% SFB) e submetidas à marcação intracelular a temperatura ambiente por 20 minutos usando mAb anti-INF- $\gamma$ -APC. As células foram lavadas novamente com PBS suplementado com 1% de SFB e posteriormente submetidas à análise por citometria de fluxo.

Para avaliar a funcionalidade dos linfócitos T e identificar os monócitos e linfócitos B, as alíquotas de sangue periférico foram submetidas a marcação superficial com anti-CD8-FITC, anti-CD86-FITC, anti-CD3-PE, anti-CD80-PE, anti-CD28-AlexaFluor, anti-HLA-DR-PECy-7, anti-CD57-APC, anti-CD14-APC, anti-HLA-DR-PE, anti-CD19-APC, anti-CD19-FITC, anti-CD83-PE, anti-CD11c-PE-Cy-5 e anti-CD11c-APC. As amostras foram marcadas por 20 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Terminado o tempo de incubação, a suspensão celular foi submetida tanto à lise das hemácias quanto à fixação através da incubação do sangue total com solução de lise/fixação (eBioscience) por 15 minutos, sob proteção da luz. As células foram lavadas duas vezes com solução de PBS suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) e posteriormente submetidas à análise por citometria de fluxo.

As análises foram realizadas após adquirir 100.000 eventos usando os citômetro Accuri C6 (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) ou Attune (Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer) e os geradores de gráfico CFlow® e Attune NxT®. Os linfócitos e monócitos foram determinados através dos padrões de tamanho e complexidade celular após a exclusão de células mortas e *debris*.

#### **2.4 – Análises estatísticas**

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de gráfico GraphPad Prism versão 8.0 para Windows (*GraphPad*). Para determinar se duas variáveis, com distribuição não normal, eram estatisticamente diferentes para cada variável dada, foram utilizados o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e correlação de Pearson. O teste t de Student, ou ANOVA e correlação de Spearman foram aplicados para verificar se uma determinada variável, com distribuição normal, era estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. Os valores foram considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 – Características dos pacientes

O objetivo do presente estudo foi comparar o impacto da terapia oral com dimetilfumarato (DMF) e fingolimode (FGL) na proporção de diferentes subpopulações de células T circulantes, linfócitos B e monócitos em pacientes com EMRR. Para isso, amostras de sangue periférico de 11 pacientes sem tratamento (*naive*), 17 com DMF e 10 com FGL foram obtidas e submetidas a análise fenotípica através da citometria de fluxo. Como controle da doença, as mesmas análises foram conduzidas em 14 indivíduos saudáveis (grupo controle).

Como pode ser observado na Tabela 1, e como esperado, a coorte de pacientes é predominantemente feminina e caucasiana. A média de idade foi semelhante entre os pacientes, porém, os indivíduos saudáveis foram mais jovens, mas não foi observado nenhuma diferença significativa. Dentre os pacientes tratados com DMF, 41% foram previamente tratados com uma TMD e 23,5% com duas ou mais. Dados parecidos podem ser observados nos pacientes em uso de FGL: 50% receberam previamente uma TMD e 10% receberam duas ou mais. Em relação ao EDSS, a pontuação 0 predominou e a média entre os grupos foi similar. O tempo médio de tratamento foi significativamente ( $p=0,0191$ ) maior em pacientes sob terapia com FGL quando comparado aos pacientes tratados com DMF.

**Tabela 1** Características dos pacientes e indivíduos saudáveis

	EM-RR			
	Controle	Naïve	DMF	FGL
	n=14	n=11	n=17	n=10
<b>Gênero (F/M)</b>	10/4	9/2	12/5	9/1
<b>Afrodescendente</b>	3	3	5	2
<b>Caucasiano</b>	11	8	12	8
<b>Idade</b>	24 ± 3,03	35,2 ± 12,14	39,5 ± 10,62	36,7 ± 6,84
<b>Tratamento Anterior</b>				
<b>1 TMD</b>	NA* <sup>1</sup>	NA	7	5
<b>2 ou mais TMD</b>			4	1
<b>EDSS</b>	NA	1,68 ± 1,58	0,88 ± 1,59	1,7 ± 2,54
<b>Tempo de Tratamento*<sup>2</sup></b>	NA	NA	24,8 ± 4,47 <sup>#</sup>	57,6 ± 39,7 <sup>#</sup>

\*<sup>1</sup> Não aplicado \*<sup>2</sup> Em meses <sup>#</sup>p= 0,0191. EMRR: Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente; Naïve: pacientes sem tratamento; DMF: dimetilfumarato; FGL: fingolimode; TMD: Terapias Modificadoras da doença; EDSS: Escala Expandida do Estado de Incapacidade.

### 3.2 – As terapias alteram os subtipos de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> circulantes

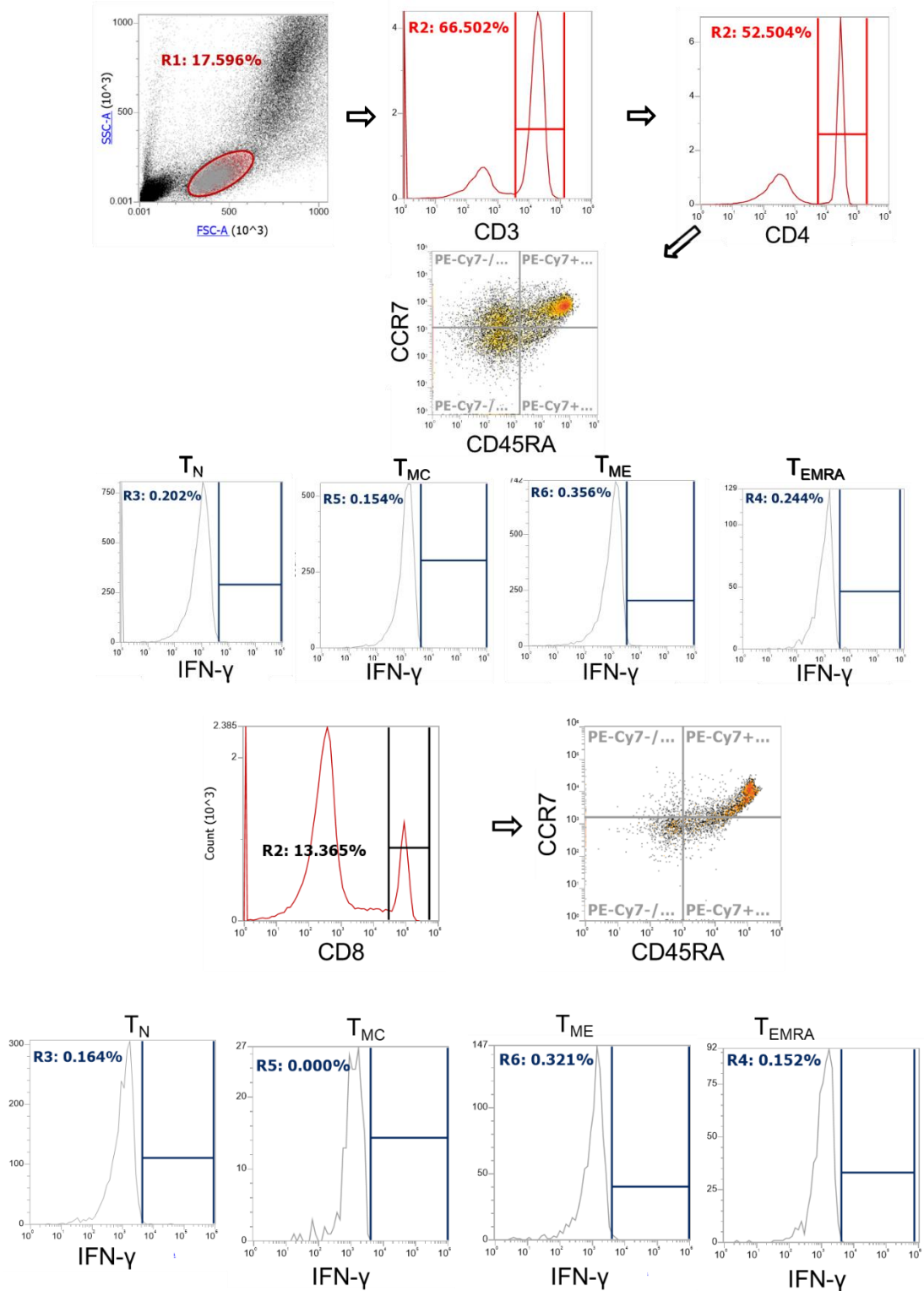
Diferente do DMF, o mecanismo de ação FGL envolve mudança no padrão de recirculação dos diferentes subtipos de células T, que podem ser identificados, através da expressão diferencial dos marcadores de superfície CD45RA e CCR7, em células T virgens (ou *naïves*, T<sub>N</sub>) (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), memória efetora (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, T<sub>ME</sub>), memória central (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>, T<sub>MC</sub>) ou células terminalmente diferenciadas (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, T<sub>EMRA</sub>).

Seguindo as estratégias de confinamento demonstradas na figura 6, nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem das células T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) e T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>) totais (Fig. 7A/7B) ou de diferentes subtipos (T<sub>N</sub>, T<sub>ME</sub>, T<sub>MC</sub> e T<sub>EMRA</sub>) (Fig. 8 A-E) entre os grupos controle e pacientes não tratados. Ao analisar o grupo de pacientes, observou-se uma redução significativa na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> totais nos pacientes tratados com FGL quando comparado aos pacientes não tratados (p= 0,0063), ou tratados com DMF (p < 0,0001). Quanto às células T CD8<sup>+</sup>, uma queda na porcentagem foi observada nos grupos de

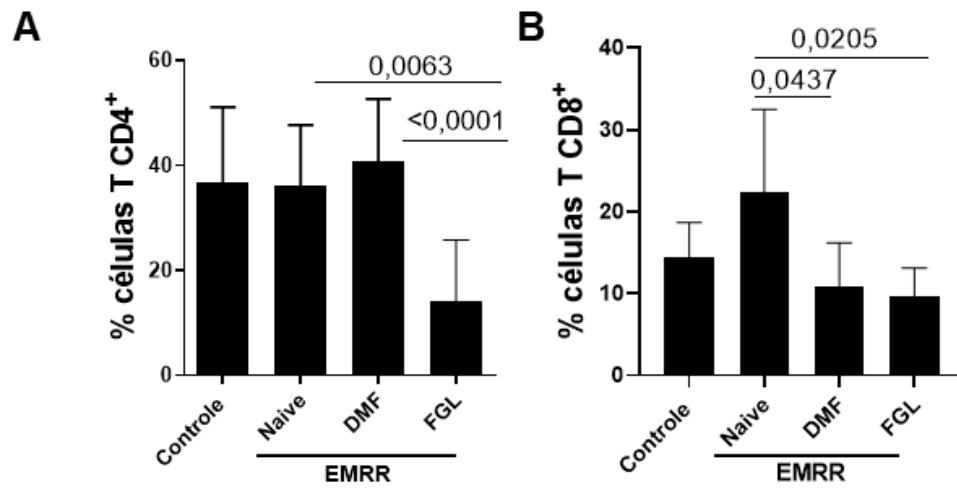
pacientes tratados (DMF  $p=0,0437$  e FGL  $p=0,0205$ ) comparados aos pacientes sem tratamento.

Quando comparado aos pacientes sem TMD, o DMF e FGL diminuíram a frequência de células T CD4<sup>+</sup> de memória efetora ( $p=0,0157$ ) e central ( $p=0,0121$ ), respectivamente (Fig 8B; 8C). Apesar da ausência de significância, quando comparado aos pacientes sem terapia, os valores médios das células T CD4<sup>+</sup><sub>N</sub> foram menores no grupo com FGL ( $p=0,0557$ ). Entre as TDM, o FGL diminuiu a proporção de células T CD4<sup>+</sup> de memória central circulantes, enquanto o DMF reduziu a porcentagem do fenótipo de memória efetora (Fig. 8A, 8B). Nenhuma diferença estatística foi observada entre a porcentagem das células T CD4<sup>+</sup> terminalmente diferenciadas entre os grupos estudados. Entre as células T CD8<sup>+</sup>, o DMF ( $p=0,0427$ ) e FGL ( $p=0,0029$ ) reduziram a porcentagem do subtipo naive quando comparado aos pacientes sem tratamento (Fig. 8E). Ademais, as proporções de células T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub> e T CD8<sup>+</sup><sub>MC</sub>, comparada aos indivíduos sem tratamento, foram significativamente reduzidas seguindo o tratamento dos pacientes com DMF (Fig. 8F) e FGL (Fig. 8G), respectivamente.

Entre os pacientes tratados, a porcentagem de células T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub> ( $p=0,0182$ ) e T CD8<sup>+</sup><sub>EMRA</sub> ( $p=0,012$ ) foi menor nos pacientes sob terapia com DMF (Fig 8F; 8H). Apesar de não ter atingido significância, a frequência de células T CD8<sup>+</sup><sub>EMRA</sub> ( $p=0,0508$ ) tende a ser maior no sangue periférico dos pacientes sob terapia com FGL quando comparado aos pacientes virgens de tratamento. Em contraste, quando comparado ao FGL, a frequência das células T CD8<sup>+</sup><sub>MC</sub> ( $p=0,0362$ ) foi maior no sangue periférico dos pacientes tratados com DMF (Fig 8G).

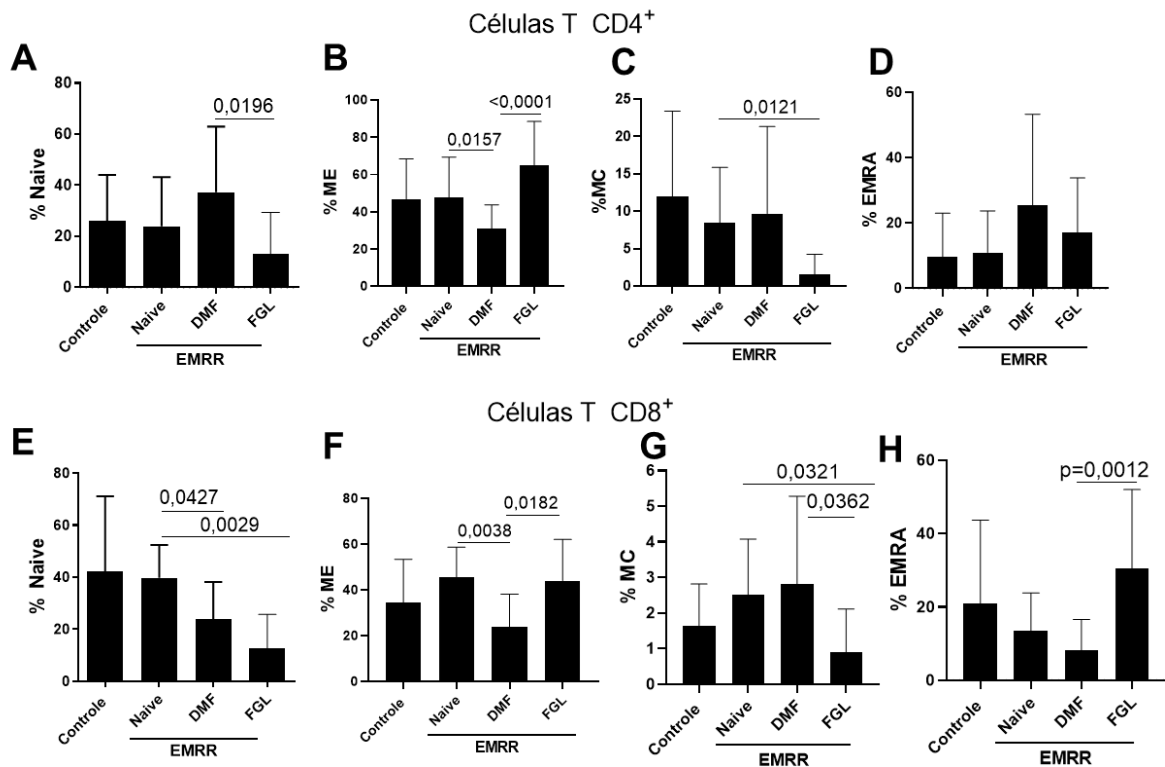


**Figura 6 Estratégia de confinamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.** Na citometria, a identificação dos linfócitos foi realizada por padrões de tamanho e complexidade celular, após a exclusão de células mortas e *debris*



**Figura 7: Porcentagem de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> circulantes em pacientes com EM.** Na figura, a porcentagem média ( $\pm$  desvio-padrão) das células T CD4<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup> (B) circulantes no grupo controle e pacientes com EMRR não tratados ou tratados com DMF ou FGL. Os valores médios foram comparados e os valores de p indicados nas figuras.





**Figura 8: Porcentagem de diferentes subtipos de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> circulantes em pacientes com EM.** Após o confinamento das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> na citometria, as células T<sub>N</sub> (A e F), T<sub>ME</sub> (C e G), T<sub>MC</sub> (D e H) e T<sub>EMRA</sub> (E e I) foram definidas como sendo CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup> e CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>, respectivamente. Os valores médios obtidos entre o grupo controle e os pacientes com EM sem tratamento (naive) ou tratados com DMF ou FGL foram submetidos a diferentes comparações e os valores de *p* indicados nas figuras.

### 3.3 Papel da TDM em modular a proporção de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> senescentes e produtoras de IFN- $\gamma$

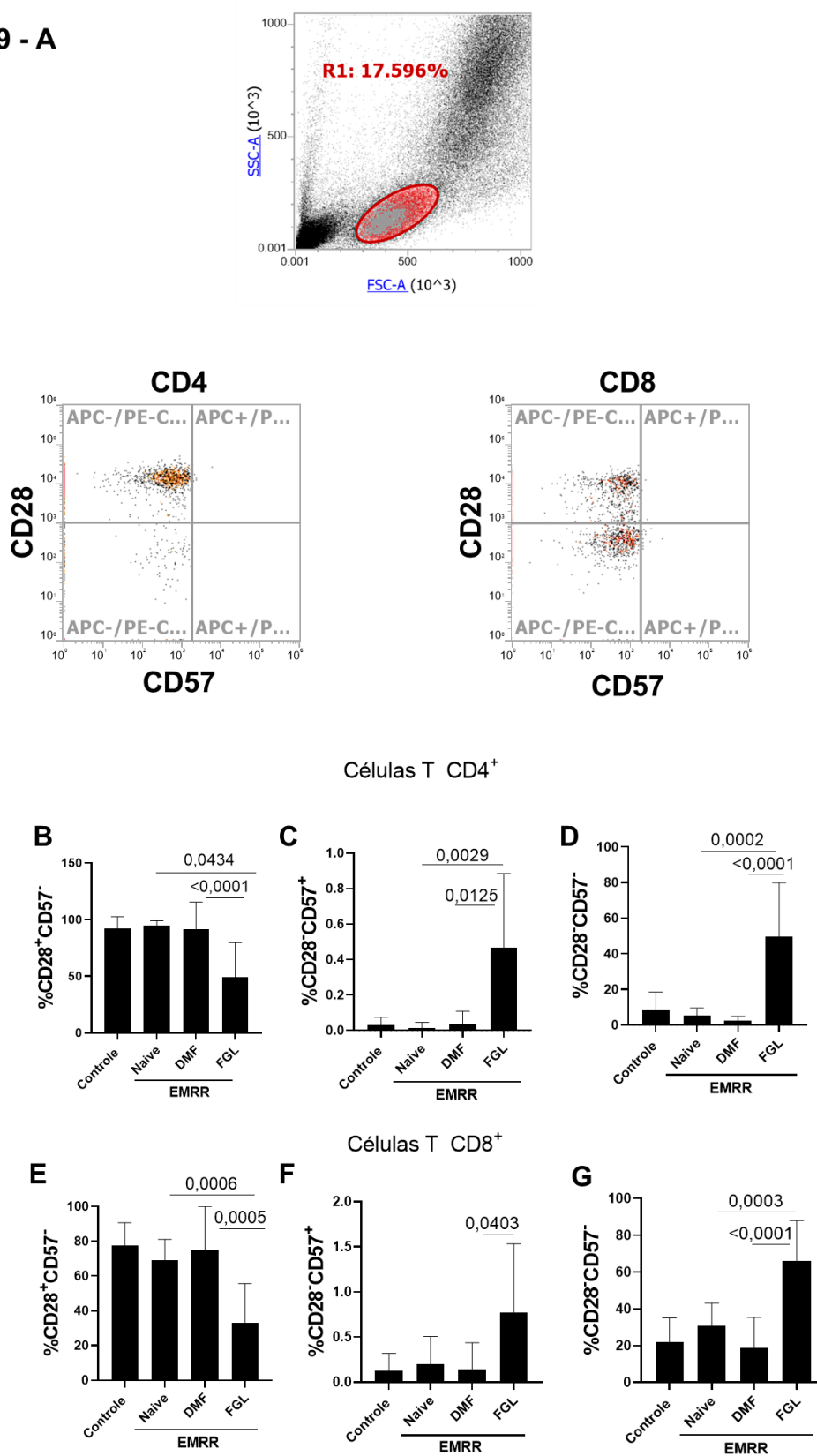
Alguns marcadores podem ajudar a determinar o potencial funcional das células T. A molécula CD28 é um marcador de célula jovem, funcional, enquanto CD57 está relacionado à senescência celular (LARBI; FULOP, 2014). Como pode ser observado na figura 9 B-G, nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) que expressam ambos marcadores de superfície nas amostras obtidas de indivíduos do grupo controle e pacientes com EM livre de TDM. O tratamento com FGL, no entanto, diminuiu a frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) CD28<sup>+</sup>CD57<sup>-</sup> quando comparado aos pacientes sem tratamento [Fig., 9 B (p=0,0434 para células T CD4<sup>+</sup>) e Fig. 9E (p=0,006 para células T CD8<sup>+</sup>)] ou sob terapia com DMF [Fig. 9B (p<0,0001 para células T CD4<sup>+</sup>) e Fig. 9E (p=0,0005 para células T CD8<sup>+</sup>)]. Em contraste, no compartimento das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, o

FGL elevou a porcentagem dos subtipos CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> (Fig. 9D) quando comparados aos pacientes não tratados [Fig. 9D ( $p=0,0002$  para células T CD4<sup>+</sup>) e Fig. 9G ( $p=0,0003$  para células T CD8<sup>+</sup>) ou tratados com DMF [Fig. 9D ( $p<0,0001$  para células T CD4<sup>+</sup>) e Fig. 9G ( $p<0,0001$  para células T CD8<sup>+</sup>)]. Se comparado aos pacientes sem tratamento ( $p=0,0029$ ) ou com DMF ( $p=0,125$ ), a terapia com FGL elevou a frequência do subtipo T CD4<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> (Fig. 9C). Esse mesmo fenômeno foi observado no compartimento das células T CD8<sup>+</sup> entre os pacientes tratados. A frequência desses linfócitos que expressam CD57 na ausência de CD28 foi significativamente maior nos pacientes sob terapia com FGL ( $p=0,0403$ ) (Fig. 9F).

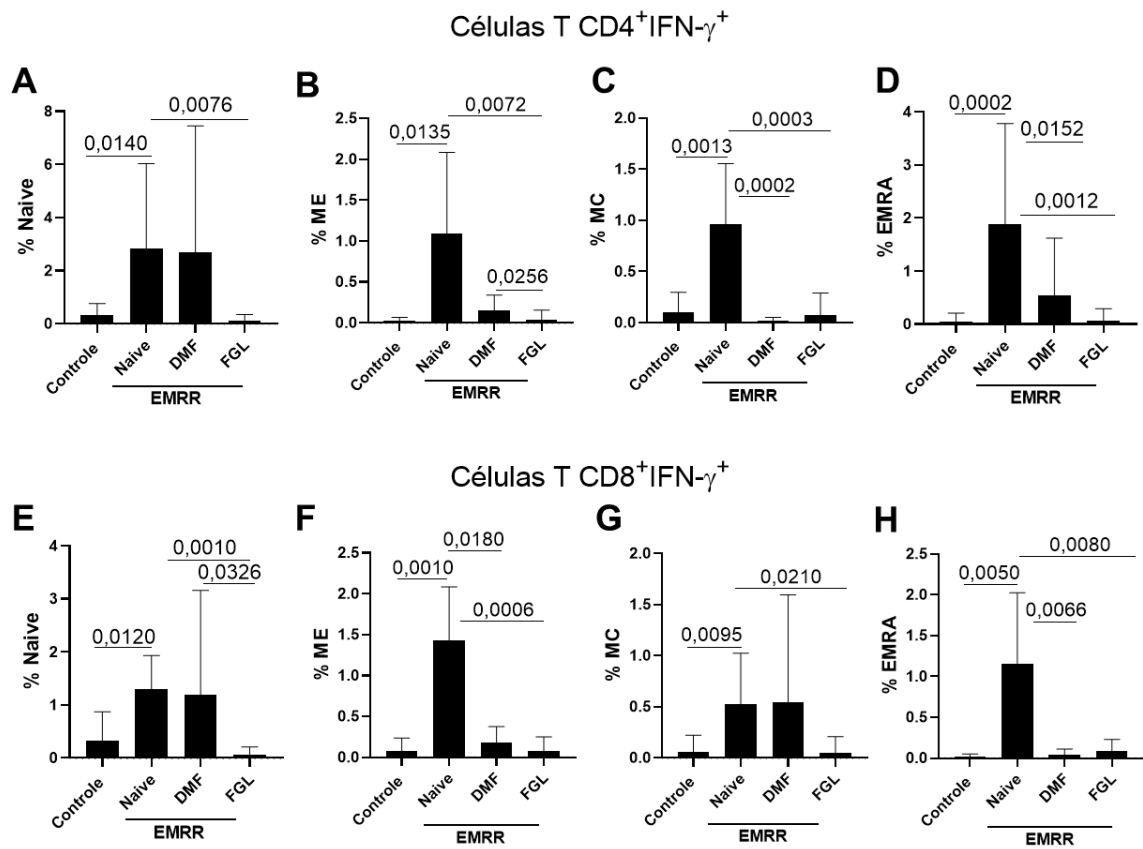
No contexto da EM, a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T contra antígenos da bainha de mielina tem sido associada às lesões desmielinizantes no SNC (SONG *et al.*, 2015). Como demonstrado na figura 10, e de forma surpreendente, a frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> foi significativamente maior, em pacientes não tratados quando comparada aos indivíduos saudáveis, não apenas em células T<sub>ME</sub> [Fig. 10.B ( $p=0,0135$  para as células T CD4<sup>+</sup>) e Fig 10F ( $p=0,0010$  para as células T CD8<sup>+</sup>)], T<sub>MC</sub> [Fig. 10C ( $p=0,0013$  para as células T CD4<sup>+</sup>) e Fig 10G ( $p=0,0095$  para as células T CD8<sup>+</sup>)] e T<sub>EMRA</sub> [Fig. 10 D ( $p=0,0002$  para as células T CD4<sup>+</sup>) e Fig 10H ( $p=0,0050$  para as células T CD8<sup>+</sup>)], como também T<sub>N</sub> [Fig. 10 A ( $p=0,0140$  para as células T CD4<sup>+</sup>) e Fig 10 E ( $p=0,0120$  para as células T CD8<sup>+</sup>)]. O tratamento dos pacientes com DMF reduziu a porcentagem das células T (CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> relacionadas aos fenótipos T<sub>EMRA</sub> (Fig. 10D). A porcentagem das células T CD4<sup>+</sup><sub>MC</sub>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> também foi reduzida de forma significativa após tratamento com DMF. Quanto ao FGL, essa droga mostrou-se mais potente em reduzir a frequência de todos os subtipos de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> no sangue periférico dos pacientes com EM quando comparados aos outros dois grupos, não tratados ou sob terapia com DMF (Fig. 10 A-H).

Quanto ao grau de incapacidade neurológica, determinada pela escala do EDSS, no presente estudo, nós observamos uma correlação direta ( $r= 0,6069$ ,  $p=0,0108$ , para as células T CD4<sup>+</sup>;  $r= 0,5585$ ,  $p=0,0216$  para as células T CD8<sup>+</sup>) entre a porcentagem das células T<sub>N</sub> CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T<sub>N</sub> CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> com a pontuação do EDSS (Tabela 2).

9 - A



**Figura 9: Análise da frequência de células T com expressão diferencial de CD28 e CD57 em pacientes com EM.** Amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com EM sem tratamento (naive) ou sob terapia com DMF e FGL foram submetidas à marcação para identificação das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> capazes de expressar os marcadores CD28 e CD57 através da citometria de fluxo.



**Figura 10: Porcentagem de diferentes subtipos de células TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> em pacientes com EM sob terapia com DMF e FGL.** As amostras de sangue de indivíduos saudáveis (controle) e pacientes não tratados ou submetidos a terapia com DMF ou FGL foram incubadas na presença de PMA e ionomicina por 3h. Após o confinamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, os diferentes subtipos de células T capazes de produzir IFN- $\gamma$  foram identificadas usando anticorpos dirigidos contra os marcadores CD4, CD8, CD45RA e CD197/CCR7, associada a marcação intracelular com IgG anti-IFN- $\gamma$  (APC). A figura mostra os valores médios  $\pm$  desvio-padrão desses diferentes subtipos de células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>.

**Tabela 2: Correlação entre a frequência dos subtipos celulares com o EDSS.**

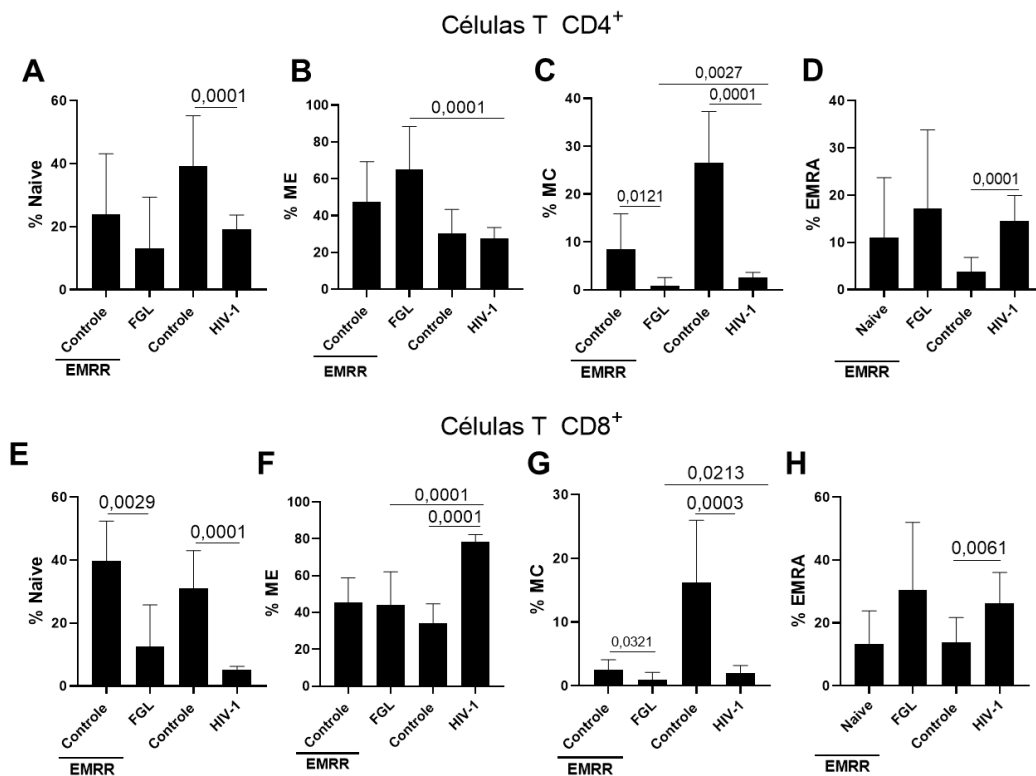
	Naive		DMF		FGL	
	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>
%TCD4 <sup>+</sup>	0,0967	0,5258	0,4040	0,2153	0,6782	0,1502
%TCD4 <sup>+</sup> N	0,6710	-0,1448	0,1093	0,4033	0,9774	0,01032
%TCD4 <sup>+</sup> MC	0,9276	-0,03280	0,5452	0,1566	0,3192	0,3469
%TCD4 <sup>+</sup> ME	0,3088	0,3384	0,3429	-0,2436	0,6480	0,1639
%TCD4 <sup>+</sup> EMRA	0,0850	0,5420	0,3519	-0,2397	0,7508	-0,1161
%TCD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> N	0,1288	0,4885	<b>0,0216</b>	<b>0,5585</b>	>0,9999	-0,04200
%TCD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> MC	0,8924	0,04697	0,4069	0,2837	0,9000	-0,2615
%TCD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> ME	0,4725	0,2395	0,4065	-0,2136	0,8000	0,09258
%TCD4 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> EMRA	0,6620	0,1558	0,0607	-0,5139	0,6202	-0,1761
%TCD8 <sup>+</sup>	0,1822	-0,4341	0,5768	0,1449	0,6194	-0,1775
%TCD8 <sup>+</sup> N	0,6194	-0,1690	0,4771	0,1838	0,1067	-0,5462
%TCD8 <sup>+</sup> MC	0,7140	-0,1251	0,0854	0,4306	0,9460	0,02466
%TCD8 <sup>+</sup> ME	0,7732	-0,09841	0,4771	0,1838	0,5294	-0,2253
%TCD8 <sup>+</sup> EMRA	0,9310	0,02968	0,6916	-0,1033	0,1714	0,4711
%TCD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> N	0,3417	0,4706	<b>0,0108</b>	<b>0,6069</b>	0,2000	0,4576
%TCD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> MC	0,4148	0,2876	0,2139	-0,3278	0,2000	0,4676
%TCD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> ME	0,6887	0,1442	0,5180	-0,1670	0,0667	0,5945
%TCD8 <sup>+</sup> INF- $\gamma$ <sup>+</sup> EMRA	0,9671	0,01503	0,4652	-0,2050	>0,9000	0,004220
%CD19 <sup>+</sup>	0,1937	0,5690	0,5651	0,1493	0,3730	0,3367
%CD14 <sup>+</sup>	0,7208	0,1512	0,8222	-0,07785	0,3770	0,3367

Os diferentes tipos e subtipos celulares foram correlacionados aos EDSS. Os valores significativos estão em negrito.

### 3.4 – O Fingolimode é mais potente que o vírus HIV-1 em reduzir a porcentagem de células T de memória central circulantes

Semelhante ao FGL, a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV-1) altera o padrão de recirculação das células T causando grave linfopenia assimétrica, com perda maior das células T capazes de acessar os órgãos linfoides secundários, o principal sítio de replicação viral (EBERHARD *et al.*, 2016). Como esperado, uma importante queda na proporção de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) virgens (Fig. 11 A/E) e de memória central (Fig. 11C/F) foi observada nos pacientes infectados pelo HIV-1 com síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), sem terapia antirretroviral, quando comparado ao seu grupo controle, indivíduos saudáveis e HIV-1 negativos. Por outro lado, a porcentagem de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>)<sub>EMRA</sub> (Figura

11D/H) e T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub> (Fig. 11F) foram significativamente maiores nos pacientes com Aids. De forma interessante, se comparado aos pacientes com Aids, o FGL foi mais potente em reduzir a proporção de células T (CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>) de memória central (Fig. 11C/G).

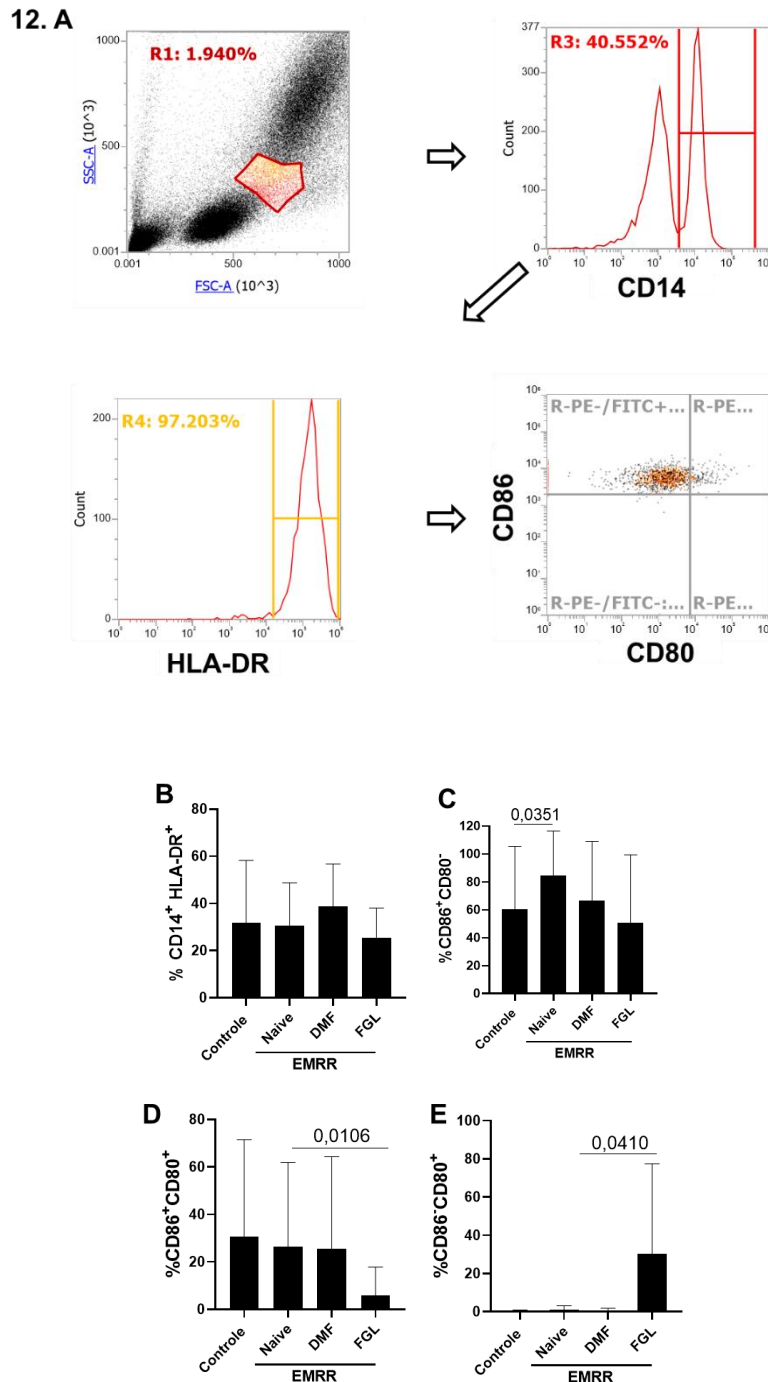


**Figura 11. Porcentagem de diferentes subtipos de células T circulantes em pacientes com EM tratados com FGL e pacientes com Aids.** A identificação das células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) virgens (naive), memória efetora (EM), memória central (CM) e terminalmente diferenciadas (TEMRA) nas amostras de indivíduos saudáveis, assim como de pacientes com EM (sem tratamento ou tratado com FGL) ou infectados pelo HIV-1 foi realizada através da citometria de fluxo usando a combinação de anticorpos dirigidos contra os marcadores CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7 e CD62L. Os valores médios foram comparados e os valores de  $p$  indicados na figura.

### 3.5 – A terapia com fingolimode eleva a proporção de monócitos ativados circulantes

Uma resposta imune eficiente mediada pelas células T depende de sua capacidade de interagir com APCs profissionais, tais como monócitos ativados, comumente identificadas pela expressão de elevados níveis de B7.2/CD86 e, principalmente, B7.1/CD80 (DILIOGLOU *et al*, 2003). Nesse sentido, pela observação da nossa estratégia de identificação dos monócitos na figura 12 (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>), nenhuma diferença significativa foi observada na porcentagem desses fagócitos em todos os grupos estudados (Fig. 12B). A porcentagem de monócitos CD86<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup> foi

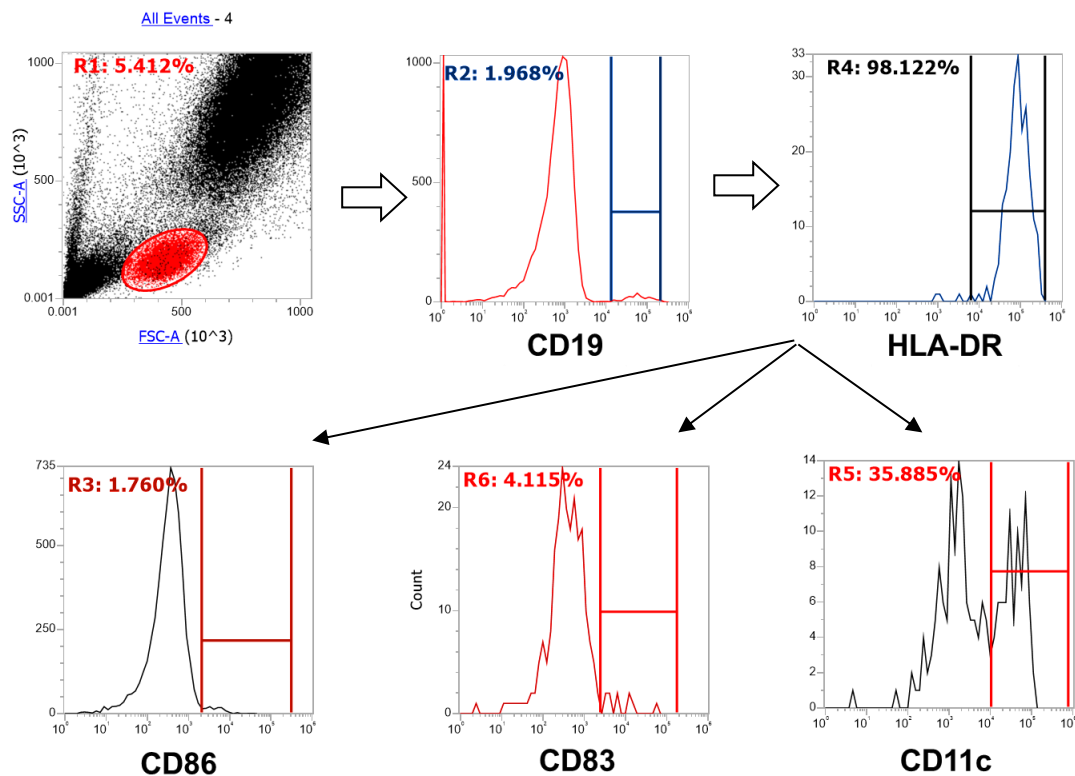
significativamente maior em pacientes não tratados ( $p=0,0351$ ) quando comparado aos indivíduos saudáveis. Dentre os pacientes tratados, apenas o FGL foi eficaz em diminuir o percentual de monócitos  $CD86^+CD80^+$  ( $p=0,0106$ ) e elevar a frequência do subtipo  $CD86^-CD80^+$  (Fig. 12 D/E).



**Figura 12: Análise do status de ativação dos monócitos de pacientes com EM sem tratamento ou tratados com DMF e FGL.** Seguindo a estratégias de confinamento (A), a porcentagem de monócitos ( $CD14^+HLA-DR^+$ ) capazes de expressar  $CD80$  e  $CD86$  foi determinada através da citometria de fluxo em amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com EM sem tratamento ou tratados com DMF e FGL.

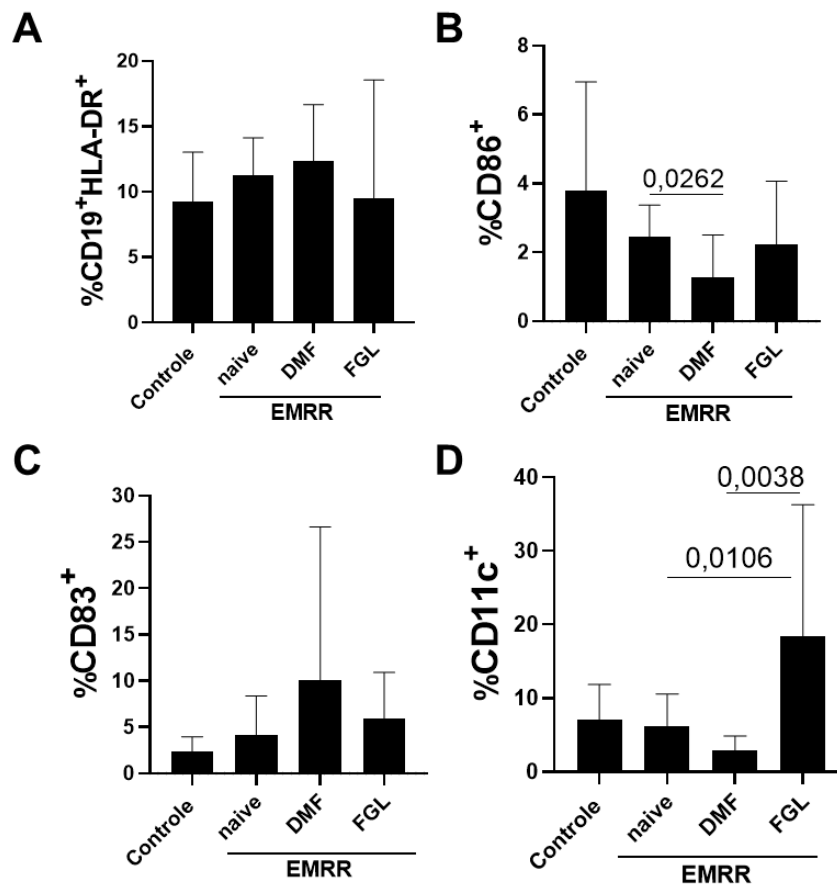
### 3.6 – O Fingolimode aumenta a frequência de células B CD11c<sup>+</sup>

Apesar das células B funcionarem como APCs, a maior contribuição da sinapse estabelecida entre as células T CD4<sup>+</sup> é a ativação das células B em células produtoras de anticorpos e geração de memória (SOSPEDRA, 2018). Diante disso, nosso último objetivo foi avaliar o quanto as diferentes TDM modulariam a proporção de diferentes subtipos de células B. Seguindo a estratégia de identificação desses linfócitos mostrada na figura 13, nenhuma diferença significativa foi observada, quanto a porcentagem de células B (CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) totais circulantes, nos diferentes grupos estudados (Fig. 14 A). Enquanto o DMF reduziu, de forma significativa, a porcentagem desses linfócitos capazes de expressar CD86 ( $p=0,0262$ ), o FGL, quando comparado aos pacientes livres de TDM, ou tratados com DMF, elevou a porcentagem de células B CD11c<sup>+</sup> circulantes (Fig. 14 B/D)



**Figura 13 Estratégia de confinamentos de linfócitos B.** Os linfócitos B (CD19+HLA-DR+) foram determinados por tamanho e complexidade celular, após a exclusão de células mortas e debris.





**Figura 14. Análise da frequência de linfócitos B capazes de expressar CD86, CD83 e CD11c em pacientes com EM sem tratamento ou tratados com DMF e FGL.** Diferentes subtipos de linfócitos B (CD19<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>) circulantes de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM sem tratamento ou sob terapia com DMF e FGL foram avaliados quanto a expressão diferencial dos marcadores de superfície CD86, CD83 e CD11c através da citometria de fluxo. Os valores percentuais médios ( $\pm$  desvio-padrão) no grupo controle e dos pacientes sem tratamento ou em terapia com DMF ou FGL foram submetidos a diferentes comparações e os valores de *p* indicados na figura.

#### 4. DISCUSSÃO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que cursa principalmente com a ocorrência de crises agudas de incapacidade neurológica seguida de remissão clínica que pode ser completa, parcial ou mesmo não existir (FRAU; LOREFICE, 2018). Por afetar principalmente jovens adultos, a EM tem grande impacto socioeconômico. Apesar da etiologia da doença ainda não ser conhecida, na forma remitente recorrente (EMRR), as deficiências neurológicas estão relacionadas a um processo inflamatório sob a coordenação de diferentes subtipos de linfócitos T efetores dirigidos contra antígenos da mielina, acarretando danos extensos aos axônios, perda de neurônios e astrogliose (INGWERSEN *et al.*, 2012). Por outro lado, estudos sugerem que o tempo em remissão clínica e radiológica também parecem depender de um conjunto de células T implicadas em tolerância imune (VASILEIADIS *et al.*, 2018). Portanto, o tratamento da EM envolve o uso de drogas para controlar as crises agudas de incapacidade neurológica, realizada com pulsoterapia, e fármacos para prevenir novas recaídas clínicas, conhecidas como terapias modificadoras da doença (TMD) (MARQUES *et al.*, 2018).

Os mecanismos de ação dessas TMD são diferentes e ainda não totalmente conhecidos. Faltam estudos comparando o impacto dessas drogas na composição de diferentes subtipos de células T circulantes, até o momento consideradas centrais na patogênese da EM. Diante disso, o objetivo principal do presente estudo foi realizar uma análise comparativa do efeito do fingolimode (FGL) com o dimetilfumarato (DMT), duas drogas orais amplamente prescritas aos pacientes com EM, na composição não apenas de diferentes subtipos de células T, como também dos monócitos e células B, dois subtipos de leucócitos também envolvidos na doença (KOUWENHOVEN *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2017).

A partir da expressão diferencial de CD45RA e dos marcadores CCR7 ou CD62L, as células T circulantes são classificadas como virgens (ou *naives*) ( $T_N$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>), memória efetora ( $T_{ME}$ , CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>), memória central ( $T_{MC}$ , CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) ou terminalmente diferenciadas ( $T_{EMRA}$ , CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>) (LIPP *et al.*, 1999). Na EMRR, um aumento na frequência de células  $T_{EM}$  tem sido observado na forma ativa da doença (OKUDA *et al.*, 2005). Em nossa coorte, no entanto, nenhuma diferença significativa foi observada na

percentagem de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) totais, nem na proporção dos subtipos de células T<sub>N</sub>, T<sub>ME</sub>, T<sub>MC</sub> e T<sub>EMRA</sub>, entre os indivíduos saudáveis (grupo controle) e pacientes com EMRR sem tratamento. A não diferença entre o grupo controle e os pacientes, quanto a percentagem de células T<sub>ME</sub> circulantes, pode ser justificada pelo fato dos pacientes incluídos no presente estudos estarem em remissão clínica. Apesar disso, alguns eventos imunes relacionados à inflamação, identificados no presente estudo, sugerem que esses pacientes, mesmo em remissão, estejam mais condicionados à ativação imune.

Quanto à terapia, apesar do pequeno tamanho de nossa amostra, o FGL diminuiu a percentagem de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) totais e do fenótipo de memória central. O DMF também reduziu a percentagem de células T CD8<sup>+</sup> totais, assim como, semelhante ao FGL, diminuiu a proporção do fenótipo virgem dentre esses linfócitos. Apenas o tratamento com DMF foi capaz de alterar a proporção das células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) de memória efetora, levando a uma queda desse fenótipo no sangue periférico. Quando comparado ao DMF, a percentagem das células T CD4<sup>+</sup> totais e T CD4<sup>+</sup><sub>N</sub>, assim como o das células T CD8<sup>+</sup><sub>MC</sub>, foi menor nos pacientes sob terapia com FGL. Finalmente, os valores médios das células T CD8<sup>+</sup><sub>EMRA</sub> foram maiores nos pacientes sob terapia com FGL.

O FGL age ligando-se ao receptor de esfingosina-1-fosfato (S1PR) e, por consequência, direciona esse receptor para degradação intracelular. A baixa disponibilidade de S1PR, associada à elevada expressão de CCR7, reduz, a capacidade dos linfócitos T de emigrarem dos gânglios linfáticos em direção à corrente sanguínea, seguindo o gradiente de concentração do lipídeo S1P, que é elevado no sangue periférico. Como consequência, pacientes sob terapia com FGL têm uma linfopenia progressiva afetando os subtipos de células T<sub>N</sub> e T<sub>MC</sub> (INGWERSEN *et al.*, 2012). No presente estudo, apesar do tratamento com FGL ter diminuído a percentagem de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>)<sub>MC</sub> e TCD8<sup>+</sup><sub>N</sub>, essa droga falhou em reduzir, de forma significativa, a frequência de células T CD4<sup>+</sup><sub>N</sub>. Levando-se em consideração que os pacientes estavam sob terapia com FGL há pelos menos 1 ano, e que foram observados durante os três primeiros meses de uso para confirmação da resposta terapêutica (MARQUES *et al.*, 2018), acreditamos que a falta de significância em algumas comparações deva-se ao pequeno número de pacientes por grupo, o que será resolvido, em breve, com aumento no número de amostras. Ainda sobre o FGL, estudo por Chun e colaboradores (2017) demonstrou um aumento na proporção das

células T CD4<sup>+</sup><sub>ME</sub> circulantes em pacientes tratados com essa droga e, no nosso estudo, observamos apenas uma tendência ( $p=0,0557$ ) desses pacientes de apresentarem uma maior frequência desse fenótipo celular, sem mudança no compartimento das células T CD8<sup>+</sup><sub>MC</sub>. Mais uma vez, ressaltamos aqui a necessidade de recrutar mais pacientes tratados com FGL para aumentar a confiança nos dados obtidos.

Quanto ao DMF, o mecanismo de ação envolve a ativação indireta do Nrf2 com consequente inibição da expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória amplamente expressos nas células T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub> (ALBRECHT *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2018; ZHU; YAMANE; PAUL, 2012). No presente estudo, no entanto, essa droga diminuiu, não somente a proporção de células T (CD4 e CD8)<sub>ME</sub>, como também das células T CD8<sup>+</sup><sub>N</sub>. Este resultado não era esperado porque os fenótipos efetores de células T são os responsáveis pela rápida produção de citocinas inflamatórias, tal como INF- $\gamma$  (HANSEN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2018). O IFN- $\gamma$  produzido pelas células T<sub>MC</sub> e T<sub>ME</sub> tem sido particularmente envolvido nas lesões desmielinizantes dentro do SNC na EM (MEHLING; RAULF, 2010). Em nosso estudo, e de forma não esperada, maiores frequências de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens foram detectados no sangue periférico dos pacientes sem tratamento ou sob uso de DMF.

Pela literatura, a capacidade das células T<sub>N</sub> em produzir citocinas inflamatórias é muito limitada e dependente de APCs profissionais, particularmente das DCs maduras (PENNOCK *et al.*, 2013). No entanto, um baixo limiar de ativação das células T<sub>N</sub> nos pacientes com EM foi descrita em um trabalho publicado por Zastepa e colaboradores (2014). Nesse estudo, os autores demonstraram que a ativação das células T<sub>N</sub> dos pacientes com EM induz uma elevada e persistente expressão de receptores do tipo *Toll* no grupo que apresentou evolução mais rápida da doença para a forma progressiva secundária, que é neurodegenerativa (ZASTEPA *et al.*, 2014). TLRs são receptores de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*) expressos principalmente nas células do sistema imune inato, quando em contato com microrganismos (TAKEDA; AKIRA, 2005). A ligação de diferentes PAMPs ativa a resposta inflamatória com repercussão no tipo de resposta imune mediada pelas células T (TAKEDA & AKIRA, 2005). Atualmente sabe-se que células T humanas ativadas expressam detectáveis níveis de TLRs (CARON *et al.*, 2005), indicando que PAMPs podem modular diretamente o comportamento funcional das células T. Coletivamente, esse achado por Zastepa e

colaboradores (2014), associado aos nossos resultados sobre a produção de IFN- $\gamma$ , sugerem que, em pacientes com EMRR, o baixo limiar de ativação das células T<sub>N</sub> possa ser um fator de risco para progressão da doença. De forma interessante, diferente do FGL, o DMF não foi capaz de reduzir a frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens, sugerindo que o efeito dessa droga seja de fato mais restrito aos fenótipos efetores de células T.

Apesar da falta de estudos na literatura sobre a biologia desses linfócitos T virgens capazes de produzir IFN- $\gamma$ , nossos resultados revelaram uma correlação positiva entre a frequência desses linfócitos com o grau de incapacidade neurológica do paciente sob terapia com DMF. Acreditamos que a ausência de correlação entre a frequência desses linfócitos e o comprometimento motor no grupo de pacientes sem tratamento possa ser justificada pela baixa atividade da doença. Dessa forma, seria interessante acompanhar se as porcentagens de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>)<sub>N</sub> capazes de produzir IFN- $\gamma$  nos pacientes virgens de tratamento seriam preditivos de progressão da doença.

Não obtivemos os valores das células T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> virgens circulantes nos pacientes tratados com TDM antes do início do tratamento, então, é possível que uma maior eficiência terapêutica do FGL, quando comparado ao DMF, seja justificada não apenas pela redução no número de células T<sub>N</sub> e T<sub>MC</sub>, como também pela capacidade dessa droga de bloquear a saída de diferentes subtipos de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dos gânglios linfáticos. Ademais, no contexto da EM, drogas que reduzem o egresso de células T CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> a partir dos órgãos linfoides secundários, virgens ou não, podem trazer maior benefício clínico ao paciente visto que esses linfócitos são classicamente citotóxicos e envolvidos na desmielinização (WAGNER *et al.*, 2020). Embora preliminares, nossos dados podem ajudar a explicar porque o FGL, e não o DMF, é a droga indicada para tratar pacientes de alto risco de progressão. Vale ressaltar que células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), capazes de produzir IL-17, são associadas, também, a EM e estudos futuros têm objetivo de determinar a frequência desse fenótipo, em diferentes subtipos celulares, a partir da marcação com CD45RA e CCR7 ou CD62L.

Finalmente, quanto as células T<sub>EMRA</sub>, comparada aos pacientes sob terapia com DMF, uma maior proporção de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> foi detectado no sangue periférico dos pacientes tratados com FGL. Uma tendência similar ( $p=0,0508$ )

foi observada quando comparamos a frequência desse fenótipo entre as amostras de pacientes não tratados e sob terapia com FGL, indicando a necessidade de aumentar o número de pacientes em cada grupo.

Obar e colaboradores demonstraram que a maioria das células  $T_{EMRA}$  é do tipo CD8 e de alto poder citotóxico (OBAR; LEFRANÇOIS, 2011; WU *et al.*, 2018). Nos pacientes com FGL, o aumento desse subtipo celular pode ser uma consequência da redução dos demais subtipos de células T circulantes. O aumento na proporção de células  $T_{EMRA}$  é uma característica de imunossenescência, sendo, portanto, particularmente observado em indivíduos acima de 60 anos, devido ao acúmulo de células T CD8<sup>+</sup> cronicamente ativadas (VISEKRUNA; HUBER, 2014). Nenhum dos nossos pacientes, tratados ou não, tinham idade acima de 60 anos. Apesar de estudos sugerirem um maior envolvimento das células  $T_{MC}$  nas lesões cerebrais dos pacientes com EM, existe a possibilidade de que o aumento na porcentagem de células T CD8<sup>+</sup> $T_{EMRA}$  no grupo com FGL seja pelo acúmulo de células T ativadas devido a maior atividade da doença. Entretanto, há ainda a probabilidade de que maior porcentagem dessas células no sangue periférico forneça proteção imune contra diferentes agentes infecciosos (HENSON; RIDDELL; AKBAR, 2012).

Apesar das células  $T_{EMRA}$  serem fenotipicamente identificadas como sendo CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>, através da expressão do CD57, esses linfócitos podem ser subdivididos em células jovens (CD57<sup>-</sup>) ou senescentes (CD57<sup>+</sup>) (VERMA *et al.*, 2017). Mesmo ambos os subtipos de  $T_{EMRA}$ , no compartimento das células T CD8<sup>+</sup>, serem citotóxicas, a ausência de expressão do marcador CD57 tem sido associada à telômeros mais longos, a uma maior capacidade proliferativa e a uma menor suscetibilidade à morte por apoptose após estimulação e produção de IFN- $\gamma$ , sendo, portanto, mais funcionais que a contraparte CD57<sup>+</sup> (VERMA *et al.*, 2017).

Estudo publicado por Henson e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão do CD45RA nas células  $T_{EMRA}$  pode auxiliar na migração desses linfócitos para tecidos e órgãos periféricos contribuindo para vigilância imunológica. Não avaliamos a expressão do IFN- $\gamma$  nas células T que expressam CD28 e/ou CD57, porém, nossos resultados demonstram maior frequência de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup> no sangue periférico de pacientes tratados com FGL quando comparado ao grupo não tratado ou sob terapia com DMF. Acreditamos que a presença desse subtipo celular possa ajudar os pacientes com EM na vigília contra patógenos, quando

comparado a outros indivíduos condicionados a perda de diferentes subtipos de células T, tais como os pacientes infectados pelo HIV-1.

O HIV-1 altera a capacidade funcional de diferentes subtipos de células do sistema imune inato e adaptativo e a maioria dos estudos aponta que a imunodeficiência nos pacientes com Aids deva-se, principalmente, aos danos causados por esse vírus, em diferentes subtipos de células T CD4<sup>+</sup>, levando a uma linfopenia assimétrica ao longo da infecção (PRIOL *et al.*, 2020). No presente estudo, assim como observado anteriormente (EBERHARD *et al.*, 2016), a infecção pelo HIV-1 leva a uma importante queda na proporção de células T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) virgens e de memória central.

Em humanos, as células T<sub>MC</sub> têm alta capacidade de renovação, proliferação, produção de IL-2 e resistência à apoptose, além da habilidade de se tornarem células T efetoras com capacidade de produzir grandes quantidades de citocinas, tais como IFN- $\gamma$ . Na infecção pelo HIV-1, a perda desse fenótipo tem sido amplamente associada à maior suscetibilidade dos pacientes a infecções oportunistas. No presente estudo, todos os pacientes HIV-1 positivos, sem uso de terapias antirretrovirais, apresentavam infecções oportunistas no momento do diagnóstico, causadas principalmente pelo *Pneumocystis jirovecii* e *Cryptococcus neoformans*. Nos pacientes com EM tratados com FGL, estudos sugerem que o controle das recaídas clínicas esteja principalmente associada ao aumento na frequência de células T<sub>MC</sub> dirigidas contra proteínas da bainha de mielina (HUNTER; BOWEN; REDER, 2016). É interessante notar que, apesar da frequência dessas células ser significativamente menor no sangue periférico dos pacientes com EM tratados com FGL comparado aos pacientes com Aids, apenas um desses pacientes com EM desenvolveu doença infecciosa grave causada pelo Papilomavírus (condiloma no colo uterino). Esses resultados sugerem que o sistema imune, sob efeito do FGL, tente compensar a queda nos índices das células T<sub>MC</sub>. Apesar de preliminares, nosso grupo acredita que essa compensação envolva, ao menos em parte, expansão de subtipos de células T<sub>EMRA</sub> circulantes.

A proporção de células T CD8<sup>+</sup><sub>ME</sub> circulantes foi maior nos pacientes com Aids quando comparado aos pacientes com EM sob terapia com FGL. Já a proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup><sub>ME</sub> foi maior em pacientes tratados com FGL quando comparado aos pacientes com Aids. Embora não tenhamos avaliado a expressão de CD28 e CD57 nas células T dos pacientes infectados pelo HIV-1 recrutados para esse estudo, vários outros têm demonstrado uma relação entre o aumento na frequência de células T

CD57<sup>+</sup>, suscetíveis à morte por apoptose, e a progressão para Aids (EBERHARD *et al.*, 2016; DEEKS, 2013). Portanto, acreditamos que o acúmulo de células T<sub>EMRA</sub> CD57<sup>-</sup> nos pacientes com EM, sob terapia com FGL, possa ajudar a explicar, ao menos em parte, o porquê da incidência de doenças oportunistas ser menor em pacientes com EM comparado aos pacientes com Aids.

A mudança na proporção de diferentes subtipos de células T deve impactar no *status* funcional de células acessórias, tais como as APCs. A ativação eficiente das células T depende de diferentes sinais fornecidos pelas APCs imunogênicas, tais como as DCs e os macrófagos/monócitos (PENNOCK *et al.*, 2013). O primeiro sinal se dá pelo contato entre o TCR e MHC ou HLA da APC, enquanto o segundo é mediado pela interação entre as moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) presentes na superfície das células acessórias com seus ligantes nas células T, a proteína CD28. Os monócitos, que representam a principal APC da imunidade inata no sangue periférico, expressam, constitutivamente, baixos níveis de CD86 (DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003). Durante a resposta imune, no entanto, não apenas a expressão de CD86 aumenta, como o CD80 é induzido.

A molécula CD80 possui uma afinidade maior com o CD28, em tempos mais tardios da resposta imune e as APCs costumam perder a expressão do CD86 (FLEISCHER *et al.*, 1996). Apesar das APCs CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup> serem menos eficientes em fagocitar, elas são superiores na ativação das células T (DILIOGLOU; CRUSE; LEWIS, 2003). Notamos que, enquanto o DMF não alterou a proporção de nenhum subtipo de monócito avaliado, uma maior porcentagem de monócitos CD80<sup>+</sup>CD86<sup>-</sup> foi detectada no sangue periférico de pacientes tratados com FGL. Uma hipótese para explicar esse achado seria uma tentativa do sistema imune do paciente tratado com FGL para compensar a perda nas células T<sub>N</sub> e T<sub>MC</sub>. Para testar essa hipótese iremos investigar futuramente o perfil de citocina desses monócitos relacionados à indução de diferentes fenótipos de células T, tais como Th1 (IL-12) e Th17 (IL-23).

Além dos monócitos, as células B, por expressarem moléculas coestimuladoras (CD80/CD86) e os marcadores CD83 e CD11c, são eficientes APCs (DUNGAN; CARRITHERS, 2019; REGINA *et al.*, 2017). Adicionalmente, a sinapse imunológica com as células T CD4<sup>+</sup>, principalmente do subtipo T<sub>FH</sub>, é fundamental para que os linfócitos B produzam anticorpos de maior afinidade e gere memória de longa duração (KU; SEIFERT, 2019). Em nosso estudo, nenhuma diferença significativa foi observada quanto a porcentagem de células B (CD19<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>) totais circulantes



nos diferentes grupos estudados. Apesar de não termos avaliado a expressão do CD80, o DMF reduziu, de forma significativa, a porcentagem desses linfócitos capazes de expressar CD86, sem alterar a proporção de outros subtipos de células B capazes de expressar CD83 ou CD11c. Por outro lado, o FGL aumentou a porcentagem de células B CD11c<sup>+</sup> sem alterar a proporção desses linfócitos capazes de expressar CD86 ou CD83.

Enquanto as moléculas CD80 e CD86 são importantes para uma eficiente ativação das células T, pesquisadores têm demonstrado o papel do CD83 em estabilizar a expressão dessas moléculas coestimuladoras, como também do complexo HLA (WONG *et al.*, 2018). O CD11c, por sua vez, ao se ligar às moléculas ICAM-2, amplifica a ativação das células T por estabilizar seu contato com a APC durante a formação da sinapse imunológica (CURTIS; MORRISON, 2017). Alguns autores sugerem que células B capazes de expressar elevados níveis de CD11c são associadas a ativação crônica e estão presentes em elevados níveis em pacientes com artrite reumatoide e lúpus, implicando o envolvimento desses linfócitos em doenças autoimunes (MA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Até o momento nenhum estudo avaliou o papel desse subtipo de célula B na EM, o que precisa ser investigado, dada a recente relação adversa entre o aumento de células B ativadas e a progressão da doença.

## CONCLUSÕES

- ✓ Apesar do mecanismo de ação do dimetilfumarato (DMF) ainda não é bem elucidado, no presente estudo a capacidade desse fármaco em diminuir a proporção de células T efectoras (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) pode ajudar no controle de novas reações nos pacientes com EM visto o caráter pró-inflamatório desse fenótipo;
- ✓ Apesar do DMF ter reduzido a proporção das células T CD8<sup>+</sup> virgens, esse fármaco não diminuiu a porcentagem desse subtipo capaz de produzir IFN- $\gamma$ , sendo ainda não clara qualquer associação entre benefício clínico e redução desses linfócitos circulantes;
- ✓ Quando comparado ao DMF, o fingolimode (FGL) foi eficiente em aprisionar subtipos de células T capazes de produzir IFN- $\gamma$ , importante citocina envolvida na patogênese da EM. É necessário investigar se o não aprisionamento dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> naives é preditivo de recidivas clínicas.
- ✓ Pacientes com EM tratados com FGL, quando comparado aos pacientes sob terapia com DMF, possuíam maior porcentagem de monócitos ativados e células T (CD4 e CD8) CD28<sup>-</sup>CD57<sup>-</sup>, o que pode representar uma tentativa do sistema imune do paciente em compensar perdas na imunidade adquirida. Acreditamos que esse fenômeno, se confirmado em um número maior de amostra, pode ajudar a entender, ao menos em parte, porque a linfopenia envolvendo fenótipos nobres de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> circulantes não expõe os indivíduos as infecções oportunistas quando comparado aos pacientes com Aids.
- ✓ Finalmente, aumento na frequência de linfócitos B CD11c<sup>+</sup>, considerado um fenótipo ativado, deve ser investigado melhor na EM desde que esse subtipo celular tem sido associado a algumas doenças autoimunes.

Coletivamente, os dados apresentados na presente dissertação, apesar de preliminares, sugerem que o fingolimode é capaz de fazer um bom equilíbrio entre benefício clínico do tratamento da EM e manutenção de uma resposta imune protetora mínima contra diferentes patógenos. Para validar essa hipótese estudo longitudinal será necessário com um número maior de pacientes, o que será conduzido por nossa equipe.

## REFERÊNCIAS

AHMED, S. I. *et al.* Risk of Multiple Sclerosis in Epstein – Barr Virus Infection. *Cureus*, v. 11, 2019.

ALBRECHT, P. *et al.* Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation. *Journal of Neuroinflammation*, v. 9, p. 1, 2012.

ATKINS, H. L. *et al.* Immunoablation and autologous haemopoietic stem-cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a multicentre single-group phase 2 trial. *The Lancet*, v. 388, p. 576–585, 2016.

BACKER, R. A. *et al.* The Fate Choice Between Effector and Memory T Cell Lineages : Asymmetry , Signal Integration , and Feedback to Create Bistability. *Elsevier*, v.137, 2018. v. 137.

BAKHURAYSAH, M. M.; SIATSKAS, C.; PETRATOS, S. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: Is it a clinical reality? *Stem Cell Research and Therapy*, v. 7, p. 1–12, 2016.

BJARTMAR, C.; WUJEK, J. R.; TRAPP, B. D. Axonal loss in the pathology of MS: Consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 206, p. 165–171, 2003.

BONASIO, R.; ANDRIAN, U. H. VON. Generation , migration and function of circulating dendritic cells. *Current Opinion of Immunology*, p. 503–511, 2006.

BUCHHOLZ, V. R.; SCHUMACHER, T. N. M.; BUSCH, D. H. T Cell Fate at the Single-Cell Level. *Annual Review of Immunology*, 2016.

CARON, G. *et al.* Direct Stimulation of Human T Cells via TLR5 and TLR7/8: Flagellin and R-848 Up-Regulate Proliferation and IFN- $\gamma$  Production by Memory CD4 + T Cells . *The Journal of Immunology*, v. 175, p. 1551–1557, 2005.

CHAIRMAN, G. A. S. *et al.* Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis : report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Annual New York Academy of Science*, 1960.

CHANG, J. T. *et al.* Asymmetric T Lymphocyte Adaptive Immune Responses. *Science* v. 315, p. 1687–1692, 2007.

COBBOLD, S. P. *et al.* CD4+ T Cell Fate Decisions Are Stochastic, Precede Cell Division, Depend on GITR Co-Stimulation, and Are Associated With Uropodium Development. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. June, p. 1–29, 2018.

CODARRI, L. *et al.* ROR $\gamma$ 3t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*, v. 12, p. 560–567, 2011.

COMI, G. *et al.* Effect of cladribine tablets on lymphocyte reduction and repopulation dynamics in patients with relapsing multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 29, n. January, p. 168–174, 2019.

COMI, G. *et al.* Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. *The New England Journal of Medicine*, p. 1293–1303, 2011.

CONNELL, P. J. O. *et al.* A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood*, v. 107, p. 1010–1018, 2016.

COOK, S. *et al.* Safety of cladribine tablets in the treatment of patients with multiple sclerosis : An integrated analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 29, p. 157–167, 2019.

COURTEN, M. DE; MATSOUKAS, J.; APOSTOLOPOULOS, V. Multiple Sclerosis : Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, p. 1–27, 2017.

CROZAT, K. Crosstalk between components of the innate immune system : promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunological Review*, v. 227, p. 129–149, 2009.

CURTIS, J. L.; MORRISON, V. L.  $\beta$  2 integrins As Regulators of Dendritic Cell , Monocyte, and Macrophage Function. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. December, 2017.

DA COSTA, D. S. M. M. *et al.* Vitamin D modulates different IL-17-secreting T cell subsets in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, v. 299, p. 8–18, 2016.

DAS, M. *et al.* Intravenous immunoglobulin mediates anti-inflammatory effects in peripheral blood mononuclear cells by inducing autophagy. *Cell Death and Disease*, 2020.

DECKX, N. *et al.* Neuroendocrine Immunoregulation in Multiple Sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2013, 2013.

DEEKS, S. G. HIV Infection, Inflammation, Immunosenescence, and Aging. *Annual Review of Medicine*, p. 141–155, 2013.

DILIOGLOU, S.; CRUSE, J. M.; LEWIS, R. E. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 75, p. 217–227, 2003.

DISANTO, G. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*, p. 823–832, 2012.

DOLEI, A. *et al.* Expression of HERV Genes as Possible Biomarker and Target in Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Science*, 2019.

- DUNGAN, M.; CARRITHERS, M. D. Immunobiology Regulation of expansion of CD11c + B cells and anti-viral immunity by epithelial V-like antigen. *Immunobiology*, p. 0–1, 2019.
- DUSABAN, S. S. *et al.* Sphingosine 1-phosphate receptor 3 and RhoA signaling mediate inflammatory gene expression in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, v. 14, p. 1–10, 2017.
- DYMENT, D. A.; EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D. Review Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurology*, v. 3, p. 104–110, 2004.
- EBERHARD, J. M. *et al.* Partial recovery of senescence and differentiation disturbances in CD8<sup>+</sup> T cell effector-memory cells in HIV-1 infection after initiation of anti-retroviral treatment. *Clinical & Experimental Immunology*, p. 227–238, 2016.
- ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R. M. Capture , crawl , cross : the T cell code to breach the blood – brain barriers. *Trends in Immunology*, v. 33, p. 579–589, 2012.
- FAZILLEAU, N.; MCHEYZER-WILLIAMS, L. J. Local development of effector and memory T helper cells. *Current Opinion of Immunology*, p. 259–267, 2007.
- FILIPPI, M. *et al.* Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, p. 1–27, 2018.
- FLEISCHER, J. *et al.* Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*, v. 89, p. 592–598, 1996.
- FLETCHER, J. M. *et al.* T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical & Experimental Immunology*, p. 1–11, 2010.
- FRAU, J. *et al.* Efficacy and safety of alemtuzumab in a real-life cohort of patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, v. 266, p. 1405–1411, 2019.
- FRAU, J.; LOREFICE, L. New horizons for multiple sclerosis therapeutics : milestones in the development of ocrelizumab. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, p. 1093–1099, 2018.
- GAFSON, A.; GIOVANNONI, G.; HAWKES, C. H. The diagnostic criteria for multiple sclerosis : From Charcot to McDonald. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 1, p. 9–14, 2012.
- GELFAND, J. M.; CREE, B. A. C.; HAUSER, S. L. Ocrelizumab and Other CD20 + B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 2017.
- GIOVANNONI, G. Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis : a new treatment paradigm. *Current Opinion of Neurology*, 2018.
- GRAF, J. *et al.* Monoclonal Antibodies for Multiple Sclerosis : An Update. *BioDrugs*, 2019.
- GRUCHOT, J.; KREMER, D.; KÜRY, P. Neural Cell Responses Upon Exposure to Human Endogenous Retroviruses. *Frontiers in Genetics*, v. 10, p. 1–7, 2019.

- HABERMAN, A. M. *et al.* Germinal center B cell initiation , GC maturation , and the coevolution of its stromal cell niches. *Immunological Review*, v. 288, p. 10–27, 2019.
- HANSEN, R. H. *et al.* Dimethyl fumarate therapy reduces memory T cells and the CNS migration potential in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, v. 37, p. 101451, 2020.
- HENRICKSON, S. E.; ANDRIAN, U. H. VON. Single-cell dynamics of T-cell priming. *Current Opinion in Immunology*, p. 249–258, 2007.
- HENSON, S. M.; RIDDELL, N. E.; AKBAR, A. N. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA. *Current Opinion in Immunology*, v. 24, p. 476–481, 2012.
- HUGUES, S. *et al.* The dynamics of dendritic cell – T cell interactions in priming and tolerance. *Current Opinion in Immunology*, 2006.
- HUNTER, S. F.; BOWEN, J. D.; REDER, A. T. The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, v. 30, p. 135–147, 29 fev. 2016.
- HUSTER, K. M.; STEMBERGER, C.; BUSCH, D. H. Protective immunity towards intracellular pathogens. *Current Opinion in Immunology*, p. 458–464, 2006.
- ILLIANO, P.; BRAMBILLA, R.; PAROLINI, C. The mutual interplay of gut microbiota , diet and human disease. *The FEBS Journal*, p. 1–23, 2020.
- INGWERSEN, J. *et al.* Fingolimod in multiple sclerosis : Mechanisms of action and clinical efficacy. *Clinical Immunology*, v. 142, p. 15–24, 2012.
- KOBELT, G. *et al.* Burden and cost of multiple sclerosis in Brazil. *Plos One*, p. 1–12, 2019.
- KOUWENHOVEN, M. *et al.* Monocytes in multiple sclerosis : phenotype and cytokine profile. *Journal of Neuroimmunology*, v. 112, p. 197–205, 2001.
- KU, R.; SEIFERT, M. Chapter 1 Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas. *Methods in Molecular Biology*, v.1956, 2013.
- LAPLAUD, D. *et al.* Comparative effectiveness of teriflunomide vs dimethyl fumarate in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 0, 2019.
- LARBI, A.; FULOP, T. From “ Truly Naive ” to “ Exhausted Senescent ” T Cells : When Markers Predict Functionality Key terms. *Cytometry*, p. 25–35, 2014.
- LEE, Y.; KUCHROO, V. Defining the functional states of Th17 cells. F1000 Research, 2015.
- LEVIN, A. B. *et al.* Meditation as an Adjunct to the Management of Multiple Sclerosis. *Neuronal Research International*, v. 2014, 2014.

LIPP, M. *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. *Nature*, v. 401, 1999.

LUCA, A. V. DE *et al.* Cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and human endogenous retrovirus W protein: Nanotechnological evidence for the potential trigger of multiple sclerosis. *Micron*, 2019.

MA, K. *et al.* Multiple functions of B cells in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, 2019.

MAHAD, D. H.; TRAPP, B. D.; LASSMANN, H. Progressive multiple sclerosis 1 Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, v. 14, p. 183–193, 2015.

MAKANI, S. S.; JEN, K. Y.; FINN, P. W. New Costimulatory Families : Signaling Lymphocytic Activation Molecule in Adaptive Allergic Responses. *Current Molecular Medicine*, v. 3, p. 359–364, 2008.

MARQUES, V. D. *et al.* Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis : Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, p. 539–554, 2018.

MARTINELLI, V. *et al.* Mitoxantrone: Benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurological Sciences*, v. 30, p. 167–170, 2009.

MATSUZAKI, G.; UMEMURA, M. Interleukin-17 as an Effector Molecule of Innate and Acquired Immunity against Infections. *Microbiology and immunology*, v. 51, p. 1139–1147, 2007.

MATUTE-BLANCH, C. *et al.* Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. *Brain*, 2018.

MCKINSTRY, K. K.; STRUTT, T. M.; SWAIN, S. L. The potential of CD 4 T-cell memory. *Immunology*, 2010

MCWILLIAM, O.; SELLEBJERG, F.; MARQUART, H. V. NU. B cells from patients with multiple sclerosis have a pathogenic phenotype and increased LT $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 response. *Journal of Neuroimmunology*, 2018.

MEHLING, M.; RAULF, F. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 2010.

MENG, H.; LEE, V. M. Differential expression of sphingosine-1-phosphate receptors 1-5 in the developing nervous system. *Developmental Dynamics*, v. 238, p. 487–500, 2009.

MICHEL, L. *et al.* Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor  $\alpha$ -chain are excluded from the analysis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 118, p. 3411–3419, 2008.

MICHEL, L.; LAROCHELLE, C.; PRAT, A. Update on treatments in multiple sclerosis. *Presse Medicale*, v. 44, p. e137–e151, 2015.

MIOSSEC, P. IL-17 and Th17 cells in human inflammatory diseases. *Microbes and Infection*, v. 11, p. 625–630, 2009.

MIRSHAFIEY, A. *et al.* T-helper 22 cells as a new player in chronic inflammatory skin disorders. *International Journal of Dermatology*, 2015.

MIYAZAKI, Y. *et al.* Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clinical Immunology*, v. 151, p. 127–135, 2014.

MIZUGISHI, K. *et al.* Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Molecular and Cellular Biology*, v. 25, p. 11113–11121, 2005.

MORANDI, E.; TANASESCU, R.; TARLINTON, R. E. Do Antiretroviral Drugs Protect From Multiple Sclerosis by Inhibiting Expression of MS-Associated Retrovirus? *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1–11, 2019.

MULS, N. G. V *et al.* Regulation of Treg-associated CD39 in multiple sclerosis and effects of corticotherapy during relapse. *Multiple Sclerosis*, p. 1–13, 2015.

NEGRON, A. *et al.* The role of B cells in multiple sclerosis: Current and future therapies. *Cellular Immunology*, v. 339, p. 10–23, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.10.006>>.

OBAR, J. J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8+ T cell differentiation. *Annual New York Academy of Science*, p. 251–266, 2011.

OKUDA, Y. *et al.* The activation of memory CD4 + T cells and CD8 + T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurological Science*, v. 235, p. 11–17, 2005.

ORTIZ, M. Á. *et al.* New Life to an Old Treatment: Pegylated Interferon Beta 1a in the Management of Multiple Sclerosis. *Current Medicine Chemistry*, p. 3272–3283, 2018.

PAOLICELLI, D. *et al.* Efficacy and Safety of Oral Therapies for Relapsing - Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 2020.

PAUNOVIC, M. *et al.* The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8 + T lymphocytes and B cells. *Brain*, p. 2066–2082, 2018.

PENNOCK, N. D. *et al.* T cell responses: naïve to memory and everything in between. *Advance in Physiology Education*, p. 273–283, 2013.

PHILLIPS, B. E. *et al.* Tolerogenic Dendritic Cells and T-Regulatory Cells at the Clinical Trials Crossroad for the Treatment of Autoimmune Disease; Emphasis on Type 1 Diabetes Therapy. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1–9, 2019.



- PIANCONE, F. *et al.* B Lymphocytes in Multiple Sclerosis : Bregs and BTLA / CD272 Expressing-CD19 + Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Nature Publishing Group*, p. 1–11, 2016.
- PONOMAREV, E. D. *et al.* GM-CSF Production by Autoreactive T Cells Is Required for the Activation of Microglial Cells and the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, v. 178, p. 39–48, 2007.
- POTENTIAL, T.; LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. Review Reactive Astrocytes : *Immunity*, v. 46, p. 957–967, 2017.
- PRIOL, Y. LE *et al.* High Cytotoxic and Specific Migratory Potencies of Senescent CD8 + CD57 + Cells in HIV-Infected and Uninfected Individuals. *Journal of Immunology*, 2020.
- QUIRANT-SÁNCHEZ, B. *et al.* Th1Th17 CM Lymphocyte Subpopulation as a Predictive Biomarker of Disease Activity in Multiple Sclerosis Patients under Dimethyl Fumarate or Fingolimod Treatment. *Mediators Inflammation*, v. 2019, 2019.
- RASOULI, J. *et al.* Expression of GM-CSF in T cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN- beta therapy. *Journal of Immunology*, v. 194, p. 5085–5093, 2016.
- REGINA, K. *et al.* A Kinetic Study of CD83 Reveals an Upregulation and Higher Production of sCD83 in Lymphocytes from Pregnant Mice. *Journal of Immunology*, v. 8, p. 1–12, 2017.
- RICE, G. P. A.; HARTUNG, H.; CALABRESI, P. A. Anti- $\alpha$  4 integrin therapy for multiple sclerosis Mechanisms and rationale. *Neurology*, 2005.
- SARKIZOVA, S.; HACOHEN, N. Systems Immunology : Learning the Rules of the Immune System. *Annual Review in Immunology*, 2019.
- SCHULZE, T. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P 4 ) deficiency profoundly affects dendritic cell function and T H 17-cell differentiation in a murine model . *The FASEB Journal*, v. 25, p. 4024–4036, 2011.
- SCOLDING, N. *et al.* Association of British Neurologists : revised ( 2015 ) guidelines for prescribing disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *Practical Neurology*, p. 1–7, 2015.
- SELLNER, J. *et al.* Immunological Aspects of Approved MS Therapeutics. *Journal of Immunology*, v. 10, p. 1–24, 2019.
- SERPERO, L. D. *et al.* Fingolimod modulates peripheral effector and regulatory T cells in MS patients. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 8, p. 1106–1113, 2013.
- SINHA, S. *et al.* CD8 + T-Cells as immune Regulators of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1–12, 2015.

- SKULINA, C. *et al.* Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 2428–2433, 2004.
- SOLIVEN, B.; MIRON, V.; CHUN, J. The neurobiology of sphingosine 1-phosphate signaling and sphingosine 1-phosphate receptor modulators. *Neurology*, v. 76, n. 8 SUPPL. 3, 2011.
- SONG, W.; CRAFT, J. T follicular helper cell heterogeneity : Time , space , and function. *Immunological Review*, v. 1, p. 85–96, 2019.
- SOSPEDRA, M. O PINION B cells in multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, v. 31, p. 256–262, 2018.
- SOUZA, L. D.; BHATTACHARYA, D. Plasma cells : You are what you eat. *Immunological Review*, v. 288, p. 161–177, 2019.
- SU-YI TSENG; JANELLE C. WALTE, M. L. S. V. M. L. D. T cells dendritic cell immunological synapses contain TCR dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase. *Journal of Immunology*, v. 181, p. 4852–4863, 2009.
- SUPPIEJ, A.; CAINELLI, E. Cognitive dysfunction in pediatric multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, p. 1385–1392, 2014.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*, v. 17, p. 1–14, 2005.
- TAN, C. *et al.* Phenotypes of Th lineages generated by the commonly used activation with anti-CD3 / CD28 antibodies differ from those generated by the physiological activation with the specific antigen. *Cellular and Molecular Immunology*, v. 11, p. 305–313, 2014.
- THOMAS, K. *et al.* Fingolimod additionally acts as immunomodulator focused on the innate immune system beyond its prominent effects on lymphocyte recirculation. *Journal of Neuroinflammation*, p. 1–13, 2017.
- TORRI, A. *et al.* Extracellular MicroRNA Signature of Human Helper T Cell Subsets in Health and Autoimmunity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 292, p. 2903–2915, 2017.
- TSELIS, A. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 3, p. 259–267, 2007.
- VAN WIJMEERSCH, B. *et al.* Autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Multiple Sclerosis: Perspective on mechanisms of action. *Journal of Neuroimmunology*, v. 197, p. 89–98, 2008.
- VASILEIADIS, G. K. *et al.* Regulatory B and T lymphocytes in multiple sclerosis : friends or foes ? *Autoimmunity Highlights*, v. 9, p. 1–15, 2018.

VENKEN, K. *et al.* Natural Naive CD4 + CD25 + CD127 low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression . *The Journal of Immunology*, v. 180, p. 6411–6420, 2008.

VERMA, K. *et al.* Human CD8 + CD57- T EMRA cells : Too young to be called " old ". *Plos One*, p. 1–14, 2017.

WISEKRUNA, A.; HUBER, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8 + T Cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, p. 449–458, 2014.

WAGNER, C. A. *et al.* Myelin-specific CD8 + T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity Graphical abstract Find the latest version : Myelin-specific CD8 + T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, p. 203–213, 2020.

WANG, Y. *et al.* Rheumatoid arthritis patients display B-cell dysregulation already in the naïve repertoire consistent with defects in B-cell tolerance. *Scientific Reports*, v. 9, p. 1–13, 2019.

WATTS, C. *et al.* Proximal effects of Toll-like receptor activation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology*, 2007.

WILLINGER, T. *et al.* Molecular signatures distinguish human central memory from Effector Memory CD8 T Cell Subsets. *Journal of Immunology*, 2005.

WING, A. C. *et al.* Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4 + T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology*, p. 212–220, 2015.

WOGNUM, A. W.; EAVES, A. C.; THOMAS, T. E. Identification and Isolation of Hematopoietic Stem Cells. *Archives of Medical Research*, v. 34, p. 461–475, 2003.

WONG, K. Y. *et al.* CD83 Antibody Inhibits Human B Cell Responses to Antigen as well as Dendritic Cell – Mediated CD4 T Cell Responses. *Journal of Immunology*, 2018.

WU, Q. *et al.* Dimethyl Fumarate Selectively Reduces Memory T Cells and Shifts the Balance between Th1/Th17 and Th2 in Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Immunology*, v. 198, p. 3069–3080, 2018.

ZASTEPA, E. *et al.* Naive CD4 T-cell activation identifies MS patients having rapid transition to progressive MS. *Neurology*, p. 681–690, 2014.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of Effector CD4 T Cell Population. p. 445–489, 2012.

**ANEXO** - Aprovação do Comitê de Ética



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**

**Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título do Projeto**

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica”**

**Título do SubProjeto:**

**“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica: comparação com a esclerose múltipla”**

Investigador Principal: Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

***EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES***

***1.1- Propósito do estudo***

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis e com pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na EM.

### **1.2- Procedimentos**

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de EM, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo auto-imune.

Após a entrevista e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.

### **1.3- Riscos e desconfortos**

*A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.*

### **1.4- Benefícios**

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à EM. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos e um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

**1.5- Alternativas para a participação**

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

**1.6- Custos e compensações**

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

**1.7- Confidenciabilidade**

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

**1.8- Direito para se retirar da pesquisa**

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar desta pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

### **1.9- Perguntas ou problemas**

*Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr<sup>a</sup>. Cláudia Crisitna Vasconcelos ou Dr<sup>a</sup>. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIO (tel: 2264-2723 ou 2531-7906).*

### **1.10- Consentimento**

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você VOLUNTARIAMENTE concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data: