



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DAS
DOENÇAS DESMIELINIZANTES ADQUIRIDAS NA FAIXA
ETÁRIA PEDIÁTRICA EM AMBULATÓRIO ESPECIALIZADO NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Alessandra Augusta Barroso Penna e Costa

**Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DAS
DOENÇAS DESMIELINIZANTES ADQUIRIDAS NA FAIXA
ETÁRIA PEDIÁTRICA EM AMBULATÓRIO ESPECIALIZADO NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Alessandra Augusta Barroso Penna e Costa

**Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018**



**Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Nacional de Saúde da Mulher,
da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira**

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DAS
DOENÇAS DESMIELINIZANTES ADQUIRIDAS NA FAIXA
ETÁRIA PEDIÁTRICA EM AMBULATÓRIO ESPECIALIZADO NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Alessandra Augusta Barroso Penna e Costa

Tese apresentada à Pós-Graduação em Pesquisa Aplicada à Saúde da Criança e da Mulher do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, da Fundação Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos
Coorientadora: Tânia Regina Dias Saad Salles

**Rio de Janeiro
Fevereiro de 2018**

CIP - Catalogação na Publicação

Penna e Costa, Alessandra Augusta Barroso .

ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS DAS DOENÇAS DESMIELINIZANTES ADQUIRIDAS NA FAIXA ETÁRIA PEDIÁTRICA EM AMBULATÓRIO ESPECIALIZADO NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / Alessandra Augusta Barroso Penna e Costa. - Rio de Janeiro, 2018.

145 f.

Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Rio de Janeiro - RJ, 2018.

Orientador: Zilton Farias Meira de Vasconcelos.

Co-orientadora: Tânia Regina Dias Saad Salles.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Doença Desmielinizante Adquirida. 2. Pediatria. 3. Esclerose Múltipla Pediátrica. 4. Imunologia. 5. Citocinas. I. Título.

Dedicatória

À minha santíssima trindade feminina: Marly, Mariana e Izabel.

Ao André, o alfa que aguenta como atlas a santíssima trindade e a mim.

A todos os pacientes do IFF e seus familiares, essa tese é para vocês.

A Dadá e Leo, meus mentores na neuro e na vida.

Agradecimentos

Tudo começou para mim quando eu entrei na neurologia pediátrica do IFF, em 2008. Um dos primeiros pacientes que avaliei e escrevi o parecer enquanto neurologista foi uma menina, na época com dois para três anos, transferida para o IFF com um quadro neurológico a esclarecer. Eu precisava mostrar conhecimento, afinal, meu concurso foi para terapia intensiva e frente aos meus mentores e uma neuropediatra de renome chamada Tania Saad, com razão, havia uma dúvida nessa ex-residente que pleiteava um lugar na neurologia pediátrica. Eu precisava fazer bonito e dar um diagnóstico à altura da exigência. A menina estava cega, sem movimentar um lado do corpo, meio desconectada do mundo. Difícil colocar todas as síndromes neurológicas que me ensinaram nela. Fui taxativa, apostando minhas fichas em algo que eu parcialmente conhecia em minhas andanças pelo mundo: ADEM. Tratada como, ela inicialmente melhorou. Chamei atenção de Tania, a neuropediatra importante para mim, além dos meus mentores que já me conheciam e sabiam que talvez eu levasse jeito para coisa.

Pouco tempo depois, na terapia intensiva, me deparei com um outro parecer tão confuso quanto. Dessa vez era uma menina mais velha, inteligentíssima, incapaz de se movimentar do pescoço para baixo, com um exame neurológico que eu tive que imprimir o mapa de dermatômos para justificar o mesmo diagnóstico, ADEM. Melhorou com o tratamento e, ponto para mim novamente.

Acertei em um diagnóstico. Errei evolutivamente no outro. Anos mais tarde a menina inteligente faz um novo quadro neurológico dramático. Foi

diagnosticada como NMOSD, tratada e abriu um mundo chamado neuroimunologia na minha vida acadêmica.

Chegaram outros pacientes, com clínica semelhante, mas desfechos diferentes. NMOSD? EMP? Mas são doenças de adulto, não há descrição em pediatria. Estava redondamente enganada. Havia descrições, mas todas conflituosas. O primeiro consenso no conjunto de DDA foi publicado em 2007.

Tânia, pesquisadora e mãe do projeto, juntou todos esses pacientes, viu que havia algo semelhante entre eles e sugeriu que estudássemos essas crianças/adolescentes de uma melhor maneira. Dr. Leonardo Azevedo, meu mestre e mentor principal, desenvolvia um estudo sobre imunologia em pacientes neonatos vítimas de sofrimento fetal. A ideia veio de Tânia com apoio de Leonardo: e se estudássemos melhor as bases imunológicas desses pacientes mais velhos? Será que encontraríamos alguma resposta?

Entre muitos erros e acertos, Tânia conseguiu chamar atenção do IFF e criar não só um ambulatório, mas também uma linha de pesquisa em doenças desmielinizantes agudas em pediatria. Fui somente um peão nesse xadrez, mas no fundo acredito que com a minha insistência e perseverança coloquei meu pensamento caótico junto a ela e ajudei indiretamente na formulação de hipóteses e talvez a propagação de ideias entre nossos residentes.

Hoje o ambulatório é um fato e recebe pacientes de várias origens, várias vivências, várias histórias. A pesquisa já rende frutos, com três dissertações de mestrado, uma tese de doutorado e outras duas teses a caminho, dois artigos publicados e apresentações em congressos. Apesar de toda dificuldade financeira e de pessoal, posso afirmar que é um sucesso. Dra. Tânia Saad se

tornou a referência em doenças desmielinizantes em pediatria no Rio de Janeiro e no Brasil. Ela possui todo o mérito.

O projeto não pode morrer. Ele tem que continuar e se multiplicar em todos os centros de neurologia pediátrica. Olhando para os neuropediatras que estão se formando conosco, vejo um futuro promissor com o desenvolvimento da linha de pesquisa. Precisamos de respostas para nossos pacientes, carentes de informação, acolhimento e esperança. Essa tese de doutorado é sobre eles e para eles.

A minha tese de doutorado é fruto da teimosia coletiva. É uma tese híbrida, meio imuno e meio neuro, tamanha a dificuldade que existe em passar os conhecimentos de bancada de laboratório para prática clínica. Com mais dúvidas que certezas, mas com a convicção de que se deve continuar estudando cada vez mais.

A todos que confiaram em mim e nessa equipe maravilhosa que nos acompanha, o meu eterno muito obrigado. Acredito que conhecimento deve ser comum a todos e não um privilégio de poucos. O conhecimento é coletivo, universal. Que ele seja multiplicado e propagado independente de credo, raça, orientação, situação financeira, inteligência, cultura.

Boa leitura para vocês.

Agradecimentos não faltam. Foram muitos que me acompanharam nessa jornada quase insana em busca do cálice sagrado.

Agradeço à Pós-graduação que acreditou que eu era capaz de assumir essa empreitada, com maior ênfase em Saint-Clair, o mago dos dados.

Ao meu orientador Zilton, que entrou nessa jornada não sabendo nem o que nem quem iria encontrar pela frente. Segurou a onda e cumpriu com maestria a orientação, tolerando meu pensamento caótico.

À Taninha, minha coorientadora e amiga que acreditou em mim e confiou o seu sonho de pesquisa clínica a essa amiga dela mais que improvável. Minha gratidão eterna.

Ao Gabriel, o cara que andou de mãos dadas comigo nesses quatro anos, o pesquisador que eu quero ser quando crescer.

A Fê Goes e Marcelinha, amigas e neuras que me acolheram em todas as angústias e foram muito compreensivas comigo, dando dicas e me apoiando.

Aos residentes e ex-residentes que acompanharam esses anos todos de delírio: Ana Paula (minha chefe), Lúcio (meu y centrado e organizado), Júlia (el mediadora), Rê Salles, Larissa, Rê, Ludi, Paulinha e Nicolle. Orgulho de participar da formação de vocês, mesmo quando tão ausente.

A todos do laboratório de neurofisiologia: Aldenys, Alice, Aninha, Dimitri, Wladimir, Mirian, Socorro, Lu, Paulo, Luciene e a diva Elisete, o que seria de mim sem vocês?

Aos amigos do IFF: Dra. Zina Azevedo (minha deusa), Dani Mancino, Luizão, todos os companheiros da UPG, ambulatórios e clínica que sabem o que essa conquista significa para mim.

Aos amigos da UPNI e IEC, que foram supercompreensivos com trocas, substituições e força.

A Ju Netto, minha irmã guerreira, pelo apoio incondicional nesses anos todos que perseguimos esse título: você no IPEC eu no IFF. Sem sua ajuda eu já teria desistido de tudo.

A Rafa e Aline, o Casal 20, lindos, que com uma paciência de Jó me apoiaram em todos os momentos.

A Fê Daniel, Raquelzinha e Siba, minhas irmãs, que me acompanharam esse tempo todo dando dicas e mandando eu ficar calma.

A todos do Plague Survivors, meus irmãos de alma em ordem alfabética: Ana, Bruno, Caio, Catita, Chiara, Clarinha, Claudio, Fábio, Flavinha, Gabriel, Julia, Let, Mari, Paulo. Vocês não sabem o quão importante são na minha vida.

A Adriana Hilu, irmã-parceira-quase-gêmea que disse que eu sou um exemplo para ela (tolinha) e está em busca de seus títulos também.

A Xande, meu maior irmão, a quem confiei mais que essa tese, nessa e nas outras encarnações (se elas existirem).

A familia: Marly, André, Sara, Nando, Cláudia, Lúcia, Marisa, Martin, Isabel, Guy, Ana, Nina, William (la mer... on va dancé...), Augusta e menção honrosa a Mariana, luz da minha vida, que me ajudou com figuras e legendas.

Last but not least, a Claudio, a pessoa que redefiniu a palavra companheirismo no meu vocabulário. Amor, amor, amor.

Sci-Hub é informação para todos. Vamos apoiar a democracia da informação.

Epígrafe

“Pois como a medicina é um compêndio dos erros sucessivos e contraditórios dos médicos, recorrendo aos melhores destes, corre-se o risco de solicitar uma verdade que será reconhecida falsa alguns anos mais tarde. De modo que acreditar na medicina seria a suprema loucura se não acreditar nela não fosse loucura maior, pois desse amontoado de erros se desvencilharam com o tempo algumas verdades.”

Marcel Proust, in “O caminho de Guermantes”,
Em Busca do Tempo Perdido, tradução Mario Quintana.

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADEM: Encefalomielite Disseminada Aguda

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC: Células Apresentadoras de Antígenos

BHE: Barreira Hematoencefálica

BOC: Banda Oligoclonal

CIS: Síndrome Clínica Isolada

DDA: Doenças Desmielinizantes Adquiridas

DIT: Disseminação no Tempo

DIS: Disseminação no Espaço

EDSS: Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke

EM: Esclerose Múltipla

EMP: Esclerose Múltipla Pediátrica

FGF: Fator de Crescimento Básico de Fibroblasto

GCSF: Fator Estimulador de Colônia de Granulócito

GMCSF: Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente

Fernandes Figueira

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL: Interleucina

INF: Interferon

IP: Proteína Induzida por Gama Interferon

IVIG: Imunoglobulina Endovenosa Humana

MCP: Proteína Quimiotática de Monócito

MHC: Complexo Maior de Histocompatibilidade

MIP1b: Proteína Inflamatória de Macrófago

MT: Mielite Transversa

MOG: Glicoproteína Mielina de Oligodendrócito

NKT: Células Natural Killer

NMO: Neuromielite Óptica

NMOSD: Espectro da Neuromielite Óptica

NO: Neurite Óptica

PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBM: Proteína Básica de Mielina

PBS: Phosphate Buffered Saline (solução tampão)

PDGF: Fator de Crescimento de Derivado de Plaqueta

PLP: Proteína Proteolipídica

RANTES: Célula T Normal Expressa e Secretada Regulada na Ativação

RM: Ressonância Magnética

SISREG: Sistema de Regulação de Estado do Rio de Janeiro

SNC: Sistema Nervoso Central

SUS: Sistema Único de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCO: Tomografia de Coerência Ocular

TLR: Receptores do Tipo Toll

Treg: Células T Regulatórias

TNF: Fator de Necrose Tumoral

VEGF: Fator de Crescimento Vascular Endotelial

Resumo

O grupo de Doenças Desmielinizantes Adquiridas (DDA) acomete o Sistema Nervoso Central (SNC) com base imunopatológica com produção de anticorpos à bainha de mielina. O diagnóstico é baseado em critérios clínico-radiológicos, sendo importante a busca por novas tecnologias para melhores diagnóstico e terapêutica. A avaliação da resposta inflamatória pode ser preditiva do curso evolutivo, sendo pouco explorada em pediatria. A proposta foi avaliar parâmetros clínico-neurológicos e perfis imunológicos nas DDA pediátricas para identificar biomarcadores dos quatro subtipos de DDA: Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM), Esclerose Múltipla Pediátrica (EMP), Síndrome Clínica Isolada (CIS) e Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD). Foi realizado um estudo prospectivo, longitudinal com portadores de DDA com até 18 anos de idade no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do IFF no período de 2012 a 2016. Os pacientes foram submetidos a exame neurológico evolutivo, Ressonância Magnética (RM) e coleta de sangue para pesquisa de citocinas. Foram admitidos 30 pacientes com 12 exclusões e 3 perdas totalizando 15 pacientes avaliados. O diagnóstico mais encontrado foi ADEM seguido de EMP. Os painéis de citocinas foram comparados através de análise estatística e categorizados de acordo com as comparações. Os resultados foram descritos em gráficos Heatmap, Boxplot e árvore de decisões. Foi relatado um caso sobre a evolução do diagnóstico de CIS para EMP. O perfil de citocinas séricas foi realizado por análise de microarranjo líquido (Luminex) totalizando 64 amostras de sangue avaliadas. A coorte apresentou cinco pacientes ADEM, cinco EMP, dois CIS e três NMOSD. No relato de caso da paciente ALAPL, não foi encontrada sincronia temporal entre a alteração do perfil de citocinas, da RM e da avaliação neurológica concluindo que avaliações inflamatória e clínica não anteciparam eventos de desmielinização e evolução para EMP. A correlação entre dosagens de citocinas mostrou um padrão multifuncional, com a participação de moléculas associadas ao perfil inflamatório Th1, Th2, Th17, Treg, e expressão aumentada de quimiocinas e citocinas envolvidas com proliferação de diversos tipos celulares. O padrão inflamatório mais abrangente e polifuncional, com 20 citocinas significativamente mais expressas, foi entre a EMP comparadas à ADEM. Na análise de citocinas entre ADEM e MNOSD houve uma diferença estatisticamente significativa para IL-7, IL-10 e GM-CSF, com uma expressão maior nas amostras de NMOSD. Entre CIS e ADEM, apenas MIP-1b se apresentou com uma diferença estatística nos dois grupos. A IP-10 se mostrou diferencialmente expressa em EMP quando comparada a CIS. Entre EMP e NMOSD, encontramos a eotaxina aumentada em EMP. Foram criadas quatro árvores classificatórias para o diagnóstico de DDA, definindo o perfil mínimo de citocinas capazes de identificar cada tipo de DDA. Concluímos que do ponto de vista diagnóstico as citocinas IL-2, IL-7, IL-13, Basic-FGF, MIP-1b, VEGF, Eotaxina, IP-10 e TNF- γ seriam capazes de classificar todos os pacientes DDA em seus grupos específicos. Estudos multicêntricos que permitam aumentar o número de pacientes com DDA poderão auxiliar na validação dos achados desse trabalho e definir pontos de cortes mais precisos para cada nível de citocina sérica visando ao diagnóstico diferencial de DDA em pediatria.

Palavras-Chave: Doença Desmielinizante Adquirida, Pediatria, Esclerose Múltipla Pediátrica, Imunologia, Citocinas

Abstract

The group of Acquired Demyelinating Diseases (DDA) affects the Central Nervous System (CNS) with immunopathological basis with production of antibodies to the myelin sheath. The diagnosis is based on clinical-radiological criteria, being important the search for new technologies for better diagnosis and therapeutics. The evaluation of the inflammatory response can be predictive of the evolutionary course, being little explored in pediatrics. The purpose of this study was to evaluate clinical and neurological parameters and immunological profiles in pediatric ADIs to identify biomarkers of the four ADD subtypes: Acute Disseminated Encephalomyelitis (ADEM), Pediatric Multiple Sclerosis (EMP), Isolated Clinical Syndrome (CIS) and Optical Neuromyelitis Spectrum). A prospective, longitudinal study was conducted with patients with ADD up to 18 years of age at the IFF Demyelinating Diseases Clinic in the period from 2012 to 2016. The patients were submitted to evolutionary neurological examination, EDSS, Magnetic Resonance (MRI) and collection to detect cytokines. Thirty patients with 12 exclusions and 3 losses totaling 15 patients were admitted. The most common diagnosis was ADEM followed by EMP. The cytokine panels were compared between the DDAs by statistical analysis and categorized according to the comparisons. The results were described in Heatmap, Boxplot and decision tree charts. A case has been reported on the evolution of the diagnosis of CIS to PMS. Serum cytokine profile was performed by liquid microarray analysis (Luminex), totalizing 64 blood samples. The cohort presented five ADEM, five EMP, two CIS and three NMOSD patients. In the case report of the ALAPL patient, no temporal synchrony was found between the alteration of the cytokine profile, MRI and neurological evaluation, concluding that inflammatory profile evaluations and clinical examination did not anticipate events of demyelination and evolution to PMS. The correlation between cytokine dosages and ADI in pediatrics showed a multifunctional pattern with the participation of molecules associated with the inflammatory profile Th1, Th2, Th17, Treg, and increased expression of chemokines and cytokines involved with proliferation of several cell types. The most comprehensive and multifunctional inflammatory pattern, with 20 significantly more expressed cytokines, was seen among PMS compared to ADEM. In the analysis of cytokines between ADEM and MNOSD there was a statistically significant difference for IL-7, IL-10 and GM-CSF, with a greater expression in the samples of patients with NMOSD. Between CIS and ADEM, only MIP-1b presented a statistical difference in the two groups. IP-10 was differentially expressed in EMP when compared to CIS patients. Among patients with EMP and NMOSD, we found increased eotaxin in EMP. Four classification trees were created for the diagnosis of ADI, defining the minimum profile of cytokines capable of identifying each type of ADI. We conclude that IL-2, IL-7, IL-13, Basic-FGF, MIP-1b, VEGF, Eotaxin, IP-10 and TNF- γ could be classified as diagnostic groups. Multicentric studies that allow an increase in the number of patients with ADD can help to validate the findings of this study and define more precise cutoff points for each level of serum cytokine aiming at the differential diagnosis of AD in pediatrics

Keywords: Acquired Demyelinating Disease, Pediatrics, Multiple Pediatric Sclerosis, Immunology, Cytokines.

Sumário

Dedicatória	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe.....	vi
Lista de Siglas e Abreviaturas	vii
Resumo	xii
Abstract	xii
Sumário.....	xiii
Lista de tabelas	xvi
Lista de figuras	xvi
I. INTRODUÇÃO	17
II- JUSTIFICATIVA	20
III- OBJETIVO GERAL	21
IV- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
V-REFERENCIAL TEÓRICO	22
V.a- As Doenças Desmielinizantes Adquiridas em Pediatria (DDA): revisão histórica.....	22
V.b - Epidemiologia das doenças desmielinizantes adquiridas em pediatria (DDA).....	24
V.c- Manifestações clínicas das DDA	26
V.c.I- O consenso de 2012.....	26
V.c.II- Síndrome Clínica Isolada em pediatria.....	27
Considerações sobre CIS:	27
V.c.III- Encefalomielite disseminada aguda em pediatria.....	29
Considerações sobre ADEM:.....	30
V.c.IV- Esclerose múltipla pediátrica.....	31
Considerações sobre EMP:	32
V.c.V-Neuromielite óptica pediátrica	34
Considerações sobre NMOSD.....	35
V.d- Diagnóstico diferencial das DDA	36

V.e- Exames laboratoriais	37
Exame líquórico com pesquisa de bandas oligoclonais (BOC) e síntese intratecal de imunoglobulinas	38
Anticorpo antiaquaporina 4 (AQP4)	38
Anticorpo antiglicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) (47)	39
V.f-Tratamento das DD	39
V.g-Imunofisiopatologia da DDA	41
V.g.I-Histologia básica do SNC.....	41
V.g.II- Componentes do Sistema Imune	42
V.g.III- Citocinas e quimiocinas.....	46
V.g.IV-Tolerância e autoimunidade.....	48
V.g.V- Imunopatologia das DDA	50
V.g.V.I-As citocinas na fisiopatologia das DDA.....	56
VI- METODOLOGIA	62
VI.a. Local do estudo	62
VI.b. Desenho de estudo.....	63
VI.c. Casuística	64
- População do estudo	64
- Critérios de inclusão	64
- Critérios de exclusão	64
- Cálculo amostral, período ou duração do projeto	65
- Plano de recrutamento	65
- Critérios para suspender ou encerrar o estudo ou retirar os sujeitos de pesquisa	65
VI.d. Materiais, Procedimentos e Técnicas	65
- Dosagem de Citocinas.....	65
Amostras:.....	65
- Estocagem do plasma em ultrafreezer	65
-Dosagem de citocinas/quimiocinas plasmáticas.....	65
VI.e. Análises estatísticas	67
VI.f. Infraestrutura	67
VII RESULTADOS.....	68
VII.a. População do estudo.	68
VII.b. Dados Demográficos da Coorte.....	69

VII.c Evolução clínica e radiológica de um paciente com DDA: Relato de Caso	71
VII.d Análise de Citocinas	73
VII. e- Variações significativas no perfil de citocinas entre EMP e ADEM.....	74
VII.f- Variações significativas no perfil de citocinas entre NMOSD e ADEM .	75
VII.g- Variações significativas no perfil de citocinas entre CIS e ADEM	77
VII.h- Variações significativas no perfil de citocinas entre EMP e CIS	78
VII.i- Variações significativas no perfil de citocinas entre NMOSD e EMP	79
VII.j- Análise de Mapa Diagnóstico em Árvore de Decisão	80
-Árvore de decisão para ADEM:	81
-Árvore de decisão para CIS:.....	82
-Árvore de decisão para EMP:.....	83
-Árvore de decisão para NMOSD:	85
VIII. Discussão	87
IX. Conclusões:	96
X- Referências Bibliográficas	97
XI- Anexos.....	115
Anexo 1	116
Anexo 2	119
Anexo 3	123
Anexo 4	126
Anexo 5	127
Anexo 6	129
Anexo 7	134

Lista de tabelas

Tabela 1: Diagnóstico diferencial das DDA	37
Tabela 2: Dados Demográficos da Coorte de pacientes avaliados no ambulatório de pesquisa de DDA do serviço de neuropediatria do IFF/FIOCRUZ no período de novembro de 2012 a setembro de 2016.....	70
Tabela 3: Painel de citocinas estudadas divididas por grupos	74

Lista de figuras

Figura 1: Imunidade inata e adaptativa.	44
Figura 2: Principais citocinas, reações imunológicas, defesa de hospedeiro e papel nas doenças dos subgrupos TH1, TH2, TH17 e subgrupos de células T CD4+ e T auxiliares.....	48
Figura 3: Principais citocinas na patogênese da esclerose múltipla.....	62
Figura 4: Fluxograma de admissão, aplicação de critérios de inclusão e exclusão e perdas para os pacientes avaliados no ambulatório de pesquisa de DDA do serviço de neuropediatria do IFF/FIOCRUZ no período de novembro de 2012 a setembro de 2016	68
Figura 5 : Acompanhamento do caso com RM e perfil inflamatório de citocinas:	73
Figura 6: Heatmap com diferenças entre o perfil de expressão de citocinas entre os pacientes diagnosticados com ADEM e EMP.....	75
Figura 7: Boxplot entre as DDA para a citocina IL-7 (interleucina).....	76
Figura 8: Boxplot entre as DDA para a citocina IL-10 (interleucina).....	76
Figura 9: Boxplot entre as DDA para a citocina GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago)	77
Figura 10: Boxplot entre as DDA para a citocina MIP-1b (proteína inflamatória de macrófago)	78
Figura 11: Boxplot entre as DDA para a quimiocina IP-10 (proteína induzida por gama interferon-10).....	79
Figura 12: Boxplot entre as DDA para a quimiocina eotaxina.	80
Figura 13: Árvore de decisão entre os diagnósticos ADEM, não-ADEM.....	82
Figura 14: Árvore de decisão entre os diagnósticos CIS, não-CIS.....	83
Figura 15: Árvore de decisão entre os diagnósticos EMP, não-EMPI	84
Figura 16: Árvore de decisão entre os diagnósticos NMOSD, não-NMOSD	86

I. INTRODUÇÃO

As Doenças Desmielinizantes Adquiridas (DDA) em pediatria são um grupo de doenças de caráter inflamatório autoimune que acometem o Sistema Nervoso Central (SNC). São caracterizadas pela produção de anticorpos antimielina, influenciadas por fatores genéticos e epigenéticos (1,2). Pertencem a esse grupo de doenças a Síndrome Clínica Isolada (CIS), Encefalomielite Aguda Disseminada (ADEM), Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD) e Esclerose Múltipla (EM). Sua incidência é de 0,66 a 1,66/100.000 habitantes/ano (3,4). A evolução clínica pode levar a incapacidade funcional e cognitiva irreversíveis.

Nas DDA ocorre a lesão da mielina, com destruição parcial ou total dos axônios e neurônios. A doença mais estudada nas DDA é a EM. A história evolutiva da EM é variável, definindo as formas clínicas em: remitente-recorrente (surto-remissão), progressiva primária, progressiva secundária (5). A NMOSD acomete preferencialmente a medula e o nervo óptico, tendo também um caráter de remissão-recorrência.

O diagnóstico das DDA baseia-se em achados clínicos neurológicos e achados radiológicos de Ressonância Magnética (RM). Em 2007 foi criado o consenso em Esclerose Múltipla Pediátrica (EMP) e doenças correlatas na infância para uniformizar o diagnóstico das DDA (6), sendo revisado em 2012 (7). Uma vez diagnosticado na fase aguda, o paciente pode ter indicação de imunossupressão (através de corticoterapia e/ou Imunoglobulina Endovenosa Humana (IVIG) e, na fase de remissão em EMP e NMOSD há indicação de imunomoduladores com o objetivo de evitar novos surtos. Os imunomoduladores aprovados pela ANVISA para pacientes maiores de dois anos de idade são: o

interferon beta; e o acetato de glatirâmer (8). Acredita-se que o paciente com EMP ou NMOSD apresente em média um surto por ano, mesmo com tratamento imunomodulador (9). A cada surto ocorre nova desmielinização que, em pediatria, acredita-se ser mais grave, por se tratar de uma doença crônica e, progressivamente incapacitante (6). Nem todos os pacientes respondem bem à terapêutica. Apesar dos avanços, ainda não existe uma forma de prever os surtos.

Novas abordagens metodológicas de parâmetros imunológicos e inflamatórios foram propostos para o diagnóstico diferencial das DDA, predição de surtos e acompanhamento da resposta aos imunomoduladores (10). A partir desses estudos nota-se uma crescente importância dos biomarcadores baseados em moléculas do sistema imune nas DDA.

Na resposta autoimune das DDA ocorre predominantemente a participação de células inflamatórias da imunidade adaptativa. O aumento de anticorpos antimielina no SNC, a presença de linfócitos T CD4+ e T CD8+ ativados, tanto no líquido (LCR) como no sangue, levam ao aumento de mediadores inflamatórios e, conseqüentemente, aumento da permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE) (11). Todo o processo resulta na mobilização de células imunes para o SNC e posterior dano à mielina nos axônios dos neurônios e oligodendrócitos (12). Os linfócitos T CD4 + são, ainda, subdivididos funcionalmente, em Th1, Th2, Th17, Treg, entre outros. A definição da função é associada ao perfil de produção de citocinas e fatores de transcrição que eles expressam (13). Estudos clínicos prévios em EM, por exemplo, já relataram diferentes citocinas em elevados níveis correlacionando-se com diferentes fases da doença. A citocina pró-inflamatória TNF- α sérica tem sido associada a fase

de surto, enquanto a IL-10 sérica, de caráter anti-inflamatória, aumenta na fase de remissão (14,15). Da mesma forma, além de mediadores inflamatórios solúveis, outros estudos correlacionaram a fase de surto com o aumento de linfócitos no sangue com o perfil Th17 (10). No entanto, a grande maioria dos estudos foram realizados em pacientes adultos, sendo escassa a literatura disponível para pacientes pediátricos.

Outro estudo que demonstra o papel crucial de mediadores inflamatórios que modulam o sistema imune durante DDA, foi realizado em pacientes de NMOSD, onde a IL-6, que encontra-se aumentada no sangue periférico desses pacientes na fase de surto, foi associada ao aumento da sobrevivência e produção de anticorpos IgG antiaquaporina-4 (AQP4) por plasmócitos (16).

Esses estudos demonstram a importância de mediadores inflamatórios e células do sistema imune na patofisiologia das DDA, podendo, inclusive, ser úteis como ferramentas de diagnóstico, prognóstico e avaliação de resposta terapêutica. Nessa linha, esse trabalho focou no potencial diagnóstico desses mediadores, diante da dificuldade na diferenciação das DDA, levando ao atraso do tratamento mais adequado nos pacientes portadores dessas doenças crônicas e debilitantes como a EM e NMOSD. Nosso estudo visou a definir um painel de fatores imunológicos/inflamatórios séricos que pudesse identificar corretamente pacientes pediátricos de EMP, NMOSD, CIS e ADEM. Utilizou-se um painel abrangente de 27 citocinas que poderiam ser classificadas em citocinas do tipo Th1, Th2, Th17, Treg, proliferativas e quimiocinas, associadas ao acompanhamento clínico-neurológico durante quatro anos de evolução clínica. Nosso desenho experimental teve o objetivo de auxiliar não somente na identificação de biomarcadores séricos com potencial diagnóstico, mas também

contribuir para um maior entendimento dos mecanismos inflamatórios e autoimunes dos pacientes com DDA.

II- JUSTIFICATIVA

As DDA pertencem a um grupo de doenças imunomediadas com possibilidade de sequelas altamente incapacitantes e irreversíveis, sendo um problema grave em Neurologia e de alto custo para o Sistema Único de Saúde (SUS). O maior acesso da população pediátrica a métodos de investigação do SNC, através das tecnologias de neuroimagem, associado ao avanço do conhecimento das DDA, resultou num melhor diagnóstico e, conseqüentemente, a incidência vem aumentando a cada ano. Entretanto, apesar do avanço tecnológico, os exames de imagem ainda não conseguem prever o curso evolutivo nos pacientes. Como são doenças correlatas, seu diagnóstico diferencial é clinicamente difícil. Normalmente depende de tempo de evolução do quadro inicial e, mesmo assim, o curso clínico das doenças nessa faixa etária ainda é muito pouco conhecido. Nesse caso, o neuropediatra necessariamente deve realizar um acompanhamento regular e contínuo em ambulatório de neurologia pediátrica especializado.

No momento, o consenso recentemente publicado define o diagnóstico das DDA na faixa pediátrica através de critérios clínico-radiológicos. No entanto, diversos estudos já associam biomarcadores diagnósticos nas DDA em adultos, sendo importante a busca por métodos que possam estabelecer esse diagnóstico diferencial precoce entre as DDA na faixa pediátrica. Estender o conhecimento sobre o perfil imunológico e inflamatório desses pacientes,

permitirá não apenas o melhor diagnóstico, mas também a melhor conduta terapêutica e consequente redução da morbidade na vida adulta. Na prática clínica, alguns biomarcadores já são utilizados, como a antiaquaporina 4 (AQP4) e o anticorpo antiglicoproteína da mielina de oligodendrócito (antiMOG) no sangue e Bandas Oligoclonais (BOC) no líquido (LCR), porém são de alto custo e sua sensibilidade na faixa pediátrica pode ser baixa, podendo ocorrer falso negativos e dificultando o diagnóstico precoce.

Nosso estudo tem como objetivo a identificação de novos biomarcadores séricos, a partir de um painel de 27 mediadores inflamatórios, que auxiliem no diagnóstico diferencial precoce entre as DDA baseado no acompanhamento clínico-radiológico evolutivo.

III- OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil de citocinas inflamatórias séricas da coorte de pacientes pediátricos com diagnóstico clínico-radiológico de doença desmielinizante adquirida pediátrica acompanhados no ambulatório de Doenças Desmielinizantes (DDA) da Infância do Setor de Neurologia do Instituto Nacional Fernandes Figueira – FIOCRUZ.

IV- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a evolução clínica e radiológica de um paciente com DDA e a dosagem de citocinas inflamatórias;

- Correlacionar as dosagens de citocinas inflamatórias com as diferentes DDA pediátricas;

- Criar uma árvore de classificação para o diagnóstico de DDA baseados nos níveis de citocinas inflamatórias.

V-REFERENCIAL TEÓRICO

V.a- As Doenças Desmielinizantes Adquiridas em Pediatria (DDA): revisão histórica

A definição das doenças desmielinizantes (DDA) na população pediátrica se confunde com a dificuldade do diagnóstico etiológico e fisiopatológico da própria neurologia. Apesar de relatos clínicos e de necropsia do século XIX até meados do século XX, não era possível fazer um diagnóstico diferencial preciso entre as lesões desmielinizantes (adquiridas) e as dismielinizantes (hereditárias).

A primeira descrição de uma doença que acometia a bainha de mielina dos nervos foi realizada por *Charcot* em 1886, caracterizada pela tríade clínica de tremor, ataxia e distúrbios de linguagem. Seus pupilos posteriormente descreveram lesões de esclerose em placas (*sclerosis en plaques*) em uma série de casos em pediatria (17), porém acredita-se que os primeiros casos descritos fossem de causas metabólicas hereditárias (dismielinizantes) e que as lesões de destruição da bainha de mielina já formada (desmielinização) em pacientes pediátricos semelhantes às descritas por *Charcot* fossem consequentes a trauma e infecções (18).

A Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM), por sua vez foi descrita inicialmente em 1790 (19) e posteriormente em uma série de casos em adultos e crianças no periódico *Lancet* de 1931, sugerindo a associação do evento neurológico após vacinação ou infecções como rubéola (20).

Após as primeiras descrições, o termo esclerose em placas em pediatria ficou restrito a artigos em línguas francesa e alemã. Os primeiros artigos no idioma inglês, no periódico *Pediatrics*, datavam de 1956 e 1958 com séries evolutivas de sete e 40 casos, respectivamente. Nesses casos, onde novamente há dificuldade em se fechar um diagnóstico mais preciso, foram apresentados relatos de eventos mono e multifásicos (21,22).

Em 1987 foi publicada uma série retrospectiva de 125 casos de Esclerose Múltipla (EM) com manifestações clínicas antes dos 16 anos de vida. Apesar de não haver no artigo descrição radiológica, o artigo de *Murray et al.* inferiu a possibilidade de diagnóstico na faixa etária pediátrica e seu caráter remissivo-recorrente (23).

Com o advento da neuroimagem através da ressonância magnética, uma multiplicação de trabalhos científicos, principalmente em EM, culminou com a criação e posterior revisão de critérios clínico-radiológicos em EM e doenças correlatas (24,25). Todavia a produção relacionada a faixa etária pediátrica permaneceu entre descrição de séries de casos até meados dos anos 90, quando *Ghezzi et al.*, publicou uma análise retrospectiva de 3.375 pacientes com esclerose múltipla, concluindo que 145 pacientes apresentaram sintomas neurológicos antes da idade adulta (26).

Somente em 2007 foi publicado o primeiro consenso em DDA em pediatria na tentativa de uniformizar conceitos e definições pelo *International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group* (IPMSSG) (6). O consenso foi revisado em 2012 e, para classificação clínico-radiológica dos nossos pacientes no nosso estudo, utilizamos essa revisão. De acordo com esse consenso, as DDA estão divididas em Síndrome Clínica Isolada (CIS) (englobando a Neurite Óptica – NO

e Mielite Transversa – MT como principais manifestações clínicas), Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM), Esclerose Múltipla Pediátrica (EMP) e o Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD) (7).

V.b - Epidemiologia das doenças desmielinizantes adquiridas em pediatria (DDA)

Apesar da EM ser a principal doença neurológica autoimune em adultos jovens com maior probabilidade de sequelas, não há uniformização dos dados mundiais sobre sua incidência (quantas pessoas tornaram-se doentes no ano) e prevalência (quantas pessoas estão doentes). Uma tentativa de unir os dados foi a ação conjunta entre a Organização Mundial de Saúde e a Federação Internacional de Esclerose Múltipla através do Atlas de EM de 2013, mapeando a EM no mundo. Cento e doze países contribuíram com os dados demográficos, apresentando um número mundial estimado de 2,3 milhões de pessoas com EM e uma incidência de 33 casos para cada 100.000 pessoas por ano (27).

Em pediatria, os dados também são estimativos. Nos últimos anos houve um crescente aparecimento de artigos com dados demográficos sobre a população pediátrica principalmente em países desenvolvidos como na Europa e Estados Unidos. Porém seus achados não podem ser extrapolados a outras populações no mundo (28). Infelizmente, não há uniformidade dos dados, e os artigos se restringem as incidências e/ ou prevalências em recortes das DDA.

Sobre a totalidade de DDA na população pediátrica na Islândia, a incidência foi de 1,15/100.000 (sendo EM 0,45/100.000) (29). Na Holanda, a incidência foi de 0,66/100.000 (3). Em uma coorte pediátrica multiétnica na Califórnia – Estados Unidos, a incidência foi de 1,66/100.000 habitantes (4).

A NO possui uma incidência no Canadá de 0,2 casos para cada 100.000 habitantes.(30)

A incidência de MT em pacientes menores de 16 anos foi estimada nos estudos do Canadá e Grã-Bretanha em 2 casos para 2 milhões de habitantes, com uma razão entre os sexos de 1,1:1,6, demonstrando uma discreta predominância no sexo masculino (31).

Estudos populacionais no Japão e China demonstraram uma incidência de ADEM de 0,3 a 0,6 pacientes por 100.000 habitantes por ano, sendo que na Alemanha, no Canadá e na Grã-Bretanha a incidência é 0,1 a 0,3 casos por 100.000 habitantes por ano, com idade média de 5 a 8 anos e predominância masculina (32).

O aparecimento de EMP é mais frequente na adolescência, mas relatos de séries de pacientes apontam para manifestações clínicas em pacientes de até dois anos de idade. A EMP antes de 10-12 anos de idade é rara, com uma prevalência de 1% de todos os casos de EM. A incidência na Alemanha em menores de 18 anos é 0,3 para cada 100.000 habitantes enquanto que na Itália é de 2,85 para cada 100.000 habitantes. A razão entre os sexos demonstra uma alta preponderância no sexo feminino durante a adolescência (4,5:1,0). Nos pacientes menores essa razão é inferior, mas ainda nota-se a maior frequência em meninas (33).

Em NMOSD os dados pediátricos são mais escassos. Um estudo cubano mostra a prevalência de NMOSD em pacientes abaixo de 20 anos em 0,12 para cada 100.000 habitantes, porém esse estudo foi realizado antes da definição dos critérios diagnósticos e da AQP4. Estima-se que 3 a 5% dos casos

de NMO sejam de início pediátrico com predominância no sexo feminino (7:1) (34).

No Brasil os dados também são fragmentados com relato de série de casos e pequenas coortes pediátricas. *Fragoso et al.* descreveram uma coorte retrospectiva de pacientes com diagnóstico de EM de início antes dos 16 anos na cidade de Santos, São Paulo. A prevalência geral de EM no seu estudo foi de 15,54/100.000 habitantes, sendo que 7,1% dos pacientes apresentaram sintomas antes da idade adulta (9). No estudo multicêntrico transversal sul americano sobre DDA, *Papais et al.* descreveram 246 casos com idade de início menor que 18 anos no universo de 1.917 pacientes avaliados, sendo que desses 246 casos, 11 pacientes apresentavam diagnóstico de EM e 10 pacientes de NMO até os nove anos de idade (35).

V.c- Manifestações clínicas das DDA

A clínica neurológica das DDA é bem diversa uma vez que as lesões podem acometer qualquer segmento do SNC. Para efeito didático, a descrição das manifestações mais comuns de cada doença encontra-se logo abaixo dos critérios do consenso de 2012.

V.c.I- O consenso de 2012

Em 2012 o *International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group* revisou os critérios para EMP e DDA imunomediadas correlatas, com publicação em 2013 no periódico *Multiple Sclerosis* (7). Os critérios levaram em consideração

as manifestações clínicas, os achados laboratoriais e radiológicos. As diferenças entre o consenso de 2007 e 2012 estão descritos no anexo 4.

As doenças descritas são Síndrome Clínica Isolada (CIS), Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM), Esclerose Múltipla Pediátrica (EMP) e Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD).

V.c.II- Síndrome Clínica Isolada em pediatria.

Para o diagnóstico são necessários todos os critérios abaixo:

- Um evento clínico no SNC mono ou polifocal de causa presumidamente inflamatória desmielinizante;
- Ausência de qualquer história anterior de desmielinização no SNC, ou seja, ausência de Neurite Óptica (NO), Mielite Transversa (MT) ou acometimento de tronco cerebral;
- Ausência de encefalopatia, ou seja, alteração de consciência que não possa ser explicada por febre;
- Não preenchimento dos critérios de EM por imagem de ressonância magnética (7).

Considerações sobre CIS:

CIS é uma síndrome heterogênea de caráter mono ou polifocal com sintomas clínicos de NO, MT, manifestações de tronco cerebral ou supratentoriais, com duração mínima de 24 horas.

A NO é um dos sintomas mais comuns nas DDA. Caracteriza-se por uma inflamação no nervo óptico uni ou bilateral, levando a disfunção visual, podendo

cursar com diminuição da acuidade visual, discromatopsia, borramento visual, déficits no campo visual, com dor durante a mobilização ocular e com perda de função visual iniciado entre horas ou dias e com duração de semanas. A manifestação bilateral é mais comum em menores de 10 anos (72% dos casos) enquanto a unilateral acomete preferencialmente os maiores de 10 anos (70% dos casos) (36).

Os sintomas iniciais mais comuns de MT são dorsalgia, seguido de déficits motores e sensitivos, e disfunção vesical. Os sintomas sensitivos podem ser de hiperestesia com queimação, formigamento ou hipoestesia até anestesia. Há necessidade de cateterização vesical quando da apresentação de incontinência urinária com retenção urinária, pois a ocorrência de bexiga neurogênica é relativamente frequente. Os sintomas geralmente acompanham os dermatomas e miótomos, sendo importante a caracterização dos níveis sensitivo e motor, apesar de que 40% das crianças não apresentam um nível sensitivo-motor preciso. A sintomatologia da MT pode ocorrer de forma completa ou parcial, iniciando-se em 2 a 4 dias de doença com pico no quinto ou sexto dia. Quando tratada com imunoterapia, a dor costuma ser a primeira manifestação clínica a melhorar, seguida dos sintomas motores, disfunção vesical e, por fim, da sensibilidade. Pode haver acometimento de raízes nervosas concomitantemente (descrito em RM de coluna) com uma clínica sugestiva de acometimento central e periférico chamado MT-plus. Nesses casos, a eletroneuromiografia demonstra polineuropatia axonal sensitivo motora (31).

Acredita-se que em crianças com CIS e RM normal, a probabilidade de progressão para EM é pequena, bem como de uma criança com MT e imagem localizada somente em medula evoluir para EM (37). Em adultos, porém, há

estudos que demonstram que 21% dos pacientes com CIS e RM normal podem evoluir para EM num período de 20 anos, sendo necessário, portanto o acompanhamento clínico dos pacientes pediátricos até a vida adulta (38).

V.c.III- Encefalomielite disseminada aguda em pediatria

Para o diagnóstico são necessários todos os critérios abaixo:

- Um primeiro evento clínico polifocal no SNC de causa presumidamente desmielinizante inflamatória;
- Presença de encefalopatia (alteração de consciência: estupor ou letargia ou alteração de comportamento) não explicada por febre;
- Ausência de novos sintomas clínicos e achados radiológicos na RM após três meses ou mais do início dos sintomas;
- RM de crânio anormal durante a fase aguda, ou seja, os três primeiros meses;
- Achados típicos de RM: lesões de 1 a 2 cm de tamanho difusas, pobremente demarcadas, envolvendo predominantemente a substância branca cerebral;
- Presença de lesões hipointensas em T1 na substância branca são raras;
- Podem estar presentes lesões de substância cinzenta profunda, por exemplo, talâmicas ou de glândula basal (7).

Considerações sobre ADEM:

ADEM tipicamente se apresenta com um curso monofásico (somente confirmado após observação prolongada retrospectiva). Seus sintomas clínicos e achados radiológicos podem flutuar em gravidade e evoluir nos primeiros três meses após início dos sintomas. A ADEM se caracteriza por uma encefalopatia aguda associada a manifestações polifocais geralmente após um período prodrômico sistêmico de febre, mal-estar, astenia, sonolência, náuseas e vômitos. Tipicamente a ADEM possui uma progressão de sintomas de dois a cinco dias. Pode ocorrer, em 15 a 25% dos casos, uma forma grave com necessidade de internação em terapia intensiva. Os sintomas neurológicos mais comuns são sinais piramidais, ataxia, hemiparesia, NO, envolvimento de outros nervos cranianos, crise convulsiva, déficit de linguagem e acometimento medular. Há recuperação completa dos sintomas neurológicos na maior parte dos pacientes com ADEM, com melhora clínica dias após início do tratamento medicamentoso e total recuperação em semanas ou meses após o tratamento. A mortalidade é de 1 a 3% dos casos e há chance de sequelas neurológicas como déficit cognitivo, desatenção, desordens de processamento verbal e alterações comportamentais principalmente em crianças menores de cinco anos.

(39) Um segundo evento é definido como desenvolvimento de novos sintomas após três meses dos primeiros e sem resposta ao tratamento com corticoides (40).

Aproximadamente 10% das crianças com diagnóstico de ADEM apresentam um segundo surto (com encefalopatia) em dois a oito anos após o primeiro evento, porém não é frequente. No consenso de 2013, o termo “ADEM recorrente” foi eliminado e a definição de “ADEM multifásico” foi revisada e

definida como dois episódios de ADEM separado por três meses, mas sem mais episódios futuros. O segundo evento de ADEM pode se apresentar como piora dos sintomas e das imagens antigas ou aparecimento de novos sintomas e novas imagens de RM. Episódios recorrentes de desmielinização são indicativos atualmente de manifestações clínicas de EM. Deve-se suspeitar de EM quando o segundo surto apresenta as seguintes características: sem encefalopatia, após três meses do início dos primeiros sintomas e achados de RM consistentes com disseminação das lesões no espaço. ADEM pediátrico também pode estar associado a um diagnóstico posterior de NMOSD. Nesses casos, a presença do anticorpo AQP4 facilita o diagnóstico (7).

A RM em ADEM é caracterizada por lesões múltiplas, grandes, com captação de gadolínio em 14 a 30% dos casos. Lesões em tálamo e gânglia basal são mais comuns em ADEM. O acometimento medular extenso é frequente. Laboratorialmente, pacientes com ADEM costumam ser antiaquaporina 4 (AQP4) negativa, porém Anti-MOG positiva. A presença de bandas oligoclonais (BOC) no líquido é raramente observado (39).

V.c.IV- Esclerose múltipla pediátrica

Para seu diagnóstico é necessária a presença de um dos seguintes:

- Dois ou mais episódios de manifestações neurológicas sem encefalopatia acometendo mais de uma área do SNC com causa inflamatória presumida e separado por 30 dias entre os episódios;

- Um episódio clínico-neurológico (sem encefalopatia) típico de EM com achados de RM consistentes com os critérios revisados de McDonald de 2010

para disseminação das lesões no espaço (DIS) e que, em seu seguimento a RM, apresente no mínimo uma nova lesão captante ou não captante de contraste com disseminação no tempo (DIT);

- Um episódio de ADEM seguido de um evento clínico sem encefalopatia após três meses do primeiro evento associado a lesões novas em RM que preencham os critérios de McDonald;

- Evento único, agudo em pacientes maiores de 12 anos, que não preenche critérios para ADEM e que os achados em RM preencham os critérios de DIT e DIS de McDonald (2010) (7).

Considerações sobre EMP:

A EM possui três formas clínicas descritas: forma remitente-recorrente, ou seja, em surtos, podendo entre estes haver recuperação parcial ou total dos sintomas neurológicos; forma primariamente progressiva, onde há evolução dos sintomas neurológicos sem recuperação da função neurológica; e a forma secundariamente progressiva, quando após um período de tempo com a forma remitente-recorrente a doença torna-se progressiva (41).

Em pediatria a forma remitente-recorrente é a mais comum (98% dos casos). Os sintomas neurológicos na EMP são semelhantes a forma remitente-recorrente do adulto com perda visual, parestesia, diminuição de força muscular, ataxia, diplopia, sintomas urinários. O surto inicial na EMP costuma ser monofocal em pacientes adolescentes e com acometimento de tronco cerebral e encefalopatia em pacientes menores de 10 anos, tornando o diagnóstico diferencial entre ADEM e EMP mais difícil de ser realizado no primeiro surto. Também foi descrito crises convulsivas como primeira manifestação de EMP

(33). Segundo *Gorman et al.*, os surtos são mais comuns e mais graves em pacientes pediátricos, mas a recuperação é mais rápida e com menos sequelas quando comparado a EM em adultos (42). Para avaliação da progressão da doença em pediatria até o momento não existe uma ferramenta mais adequada. Em pacientes adultos a escala mundialmente utilizada é a EDSS, porém ela se demonstra pouco sensível para o acompanhamento clínico em pediatria, já que a piora neurológica ocorre numa média de 20 anos após o início da doença. Para efeitos de pesquisa e acompanhamento ambulatorial, mesmo com as dificuldades descritas, foi utilizada a EDSS. Há muitas propostas de escalas em pediatria, porém necessitam de validação. O comitê de EMP sugere acompanhamento clínico regular com exame neurológico seriado, EDSS, avaliação cognitiva, tomografia de coerência ocular (TCO) e questionários sobre qualidade de vida (33).

Os critérios de Mc Donald foram descritos em 2001 e revisados em 2005 e 2010. Baseados nas imagens de RM, os critérios estabeleceram para o diagnóstico de EM a definição de disseminação de lesões no tempo (DIT) e no espaço (DIS), sendo fundamental para o diagnóstico mais precoce de EM com boa sensibilidade e especificidade (43). O consenso de pediatria publicado em 2013 incorporou os critérios de Mc Donald para o diagnóstico das DDA (7).

A principal dificuldade no diagnóstico de EMP é principalmente em pacientes com alto risco de desenvolver a doença, mas não possuem os critérios clínicos nem radiológicos acima estabelecidos. Um exemplo seria um paciente com ADEM que apresenta NO e RM de acompanhamento evolutivo, onde fica evidente a resolução das lesões antigas e ausência de lesões novas. Esse paciente poderia ser classificado como NMOSD, NO inflamatória recorrente ou

EMP, onde apenas o desenvolvimento do acompanhamento neurológico ambulatorial regular poderá ser resolutivo. Pacientes com ADEM sem novos eventos clínicos, mas que apresentem, evolutivamente, RM com aparecimento de novas lesões (DIS), não preenchem critérios para EMP. No entanto, esses pacientes devem realizar seguimento neurológico regular (44).

Pacientes com diagnóstico de EMP, menores de 12 anos, apresentam diferenças clínicas quando comparados aos adolescentes. Esses pacientes possuem maior chance de apresentarem seu primeiro surto clínico e radiológico semelhante a ADEM, com lesões grandes e mal definidas em RM e podem apresentar pesquisa de BOC negativa, demonstrando a baixa sensibilidade desse biomarcador tão importante na EM em adultos. Porém, independentemente da idade, cerca de 96% de todos os pacientes em faixa etária pediátrica, apresentam seu curso clínico sob a forma remitente-recorrente (45).

V.c.V-Neuromielite óptica pediátrica

Para o diagnóstico são necessários todos os critérios abaixo:

- Neurite óptica;
- Mielite aguda;

E, no mínimo, dois dos três critérios abaixo:

- Lesão contígua medular em pelo menos três segmentos medulares visto em RM;
- Achados radiológicos em RM de crânio que não preenchem critérios de EM;

- Presença de anticorpo antiaquaporina- 4 IgG (AQP4) (7).

Considerações sobre NMOSD

Pacientes pediátricos podem se apresentar no espectro da NMO (NMOSD), definida como manifestações remitente-recorrentes de neurite óptica e mielite transversa com AQP4 positivo no soro. A RM de crânio pode apresentar lesões inicialmente sugestivas de ADEM com lesões supratentoriais, de tronco cerebral e hipotalâmicas (7).

Em 2016, *Tenembaum et al.* em artigo de revisão sobre NMO em pediatria reitera a definição de NMOSD na população pediátrica, demonstrando que a apresentação inicial de NO ocorre em 50 a 75% dos casos de NMOSD e MT entre 30 a 50%, com ou sem concomitância. Pode também ocorrer uma apresentação clínica “ADEM-like” em 10% dos casos, levando a um diagnóstico mais complicado. Ocorre uma associação temporal com infecções como influenza e herpes e há relatos de primeiro acometimento neurológico após transplante de medula óssea (34).

Na NMOSD os sintomas de tronco cerebral mais comuns são vômitos irresponsivos a medicação sintomática, com ou sem soluços, e acometimento de nervos cranianos. Podem ocorrer manifestações endocrinológicas devido ao acometimento diencefálico, como alteração na temperatura corporal, alteração de humor, entre outras. Cerca de 90% dos pacientes apresentam novos surtos. *Collongue et al.* referem em seu artigo de seguimento de pacientes com NMO que o início dos sintomas na faixa etária pediátrica foi associado a mais sequelas oftalmológicas, mais manifestações clínicas incapacitantes com declínio

cognitivo, epilepsia, afasia, narcolepsia e ataxia, além de lesões mais difusas à RM, porém a mortalidade foi menor quando comparada a adultos (46).

V.d- Diagnóstico diferencial das DDA

A apresentação de sinais e sintomas neurológicos com lesões de substância branca à RM aponta para o diagnóstico mais provável de DDA agudas. Porém, há uma gama de outras doenças que podem apresentar manifestação clínica e radiológica semelhantes havendo, portanto, a necessidade de ser incluído nesse espectro de diagnóstico diferencial um perfil mais amplo, que deve incluir três grupos de doenças: as inflamatórias, que incluem as doenças que discutimos até o momento; os tumores de SNC; e as doenças neurometabólicas. Abaixo segue a tabela expandida de diagnóstico diferencial (47):

Tabela 1: Diagnóstico diferencial das DDA

Doenças Infecciosas/Inflamatórias	Tumores do SNC	Doenças Neurometabólicas
Lúpus eritematoso sistêmico	Astrocitoma	Neuropatia óptica hereditária de Leber
Doença de Beçet	Glioma	Síndrome de Kearns-Sayre
Neurossarcoidose	Oligodendroglioma	Síndrome de Leigh
Angeíte primária do SNC	Ependimoma	Doenças relacionadas a gama polimerase
Linfocitose hemofagocítica	Linfoma de SNC	Leucoencefalopatas associadas a lesões
Imunodeficiências	Histiocitose	Encefalopatia Necrotizante aguda
Neuroborreliose		Doença da gânglia basal responsiva a biotina
Leucoencefalopatia progressiva multifocal		
Encefalopatia autoimune		
Encefalopatia associada a tireoidite autoimune		
Cerebelite		
Síndrome de Guillain Barré e variantes		

V.e- Exames laboratoriais

Os critérios diagnósticos descritos anteriormente demonstram o caráter clínico- radiológico das DDA. Porém, há exames laboratoriais que podem auxiliar no diagnóstico.

Em seu artigo, *Rostasy* (47) sugere os seguintes exames laboratoriais iniciais para investigação das DDA além da RM, de acordo com a suspeita diagnóstica.

Exame líquórico com pesquisa de bandas oligoclonais (BOC) e síntese intratecal de imunoglobulinas

A avaliação líquórica é de grande importância para o diagnóstico das doenças desmielinizantes. Um estudo de *Chabas et al.* avaliou o líquido de pacientes categorizados por faixas etárias e descreveu que em pacientes com EMP menores de 11 anos há maior número de leucócitos e neutrófilos quando comparados aos adolescentes (48). A presença de bandas oligoclonais (BOC) no líquido com síntese intratecal de imunoglobulinas é considerado patognomônico para o diagnóstico de EM. Porém, em crianças com idade abaixo de 11 anos, sua positividade é menor (43 a 60%) quando comparado a pacientes adolescentes (63 a 73%). Quanto maior o número de surtos, maior a chance de presença de BOC no líquido, mais uma vez indicando que a faixa pediátrica deva ser a de mais baixa sensibilidade ao teste (49). Em pacientes com ADEM a celularidade líquórica encontra-se normal entre 42 a 72% dos pacientes, com aumento de proteína em 23 a 62%. Porém, segundo o consenso de 2012, em ADEM é rara a presença de BOC e síntese intratecal de imunoglobulinas (32). Na NMOSD ocorre pleocitose em 35% dos pacientes com presença de linfócitos ou neutrófilos e ausência de síntese intratecal de imunoglobulinas e BOC.

Anticorpo antiaquaporina 4 (AQP4)

A presença no soro do anticorpo que ataca os canais de água aquaporina 4 (AQP4) presente nos astrócitos é altamente específico ao

diagnóstico de NMOSD, tendo inclusive um potencial patogênico. Ou seja, as manifestações clínicas decorrentes do acometimento do nervo óptico e da medula são pela maior presença dos canais de AQ4 presentes nesses locais (50). Em crianças, sua positividade é menor principalmente no primeiro surto (51).

Anticorpo antiglicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG) (47)

O anticorpo anti MOG está mais presente nos pacientes pediátricos com DDA em comparação com os adultos. Sua positividade é maior em ADEM, ADEM com manifestação de NO, NO associado MT recorrente, NO recorrente, e menor em EMP. Acredita-se que sua positividade indica uma doença mais monofásica com menor gravidade de sintomas e melhor recuperação clínica. A função do MOG ainda não foi claramente estabelecida, porém há evidência da patogenicidade do antiMOG com alteração do citoesqueleto do oligodendrócito (52). Recentemente foi descrito por *Becker et al.* a associação de anti MOG-IgG com neurite óptica em adultos, sugerindo que MOG-IgG é um biomarcador de doença desmielinizante diferente da EM (53).

V.f-Tratamento das DD

Uma vez diagnosticado, o paciente em surto de DDA recebe tratamento de imunossupressão (corticoterapia preferencialmente com metilprednisolona ou IVIG) e, nos pacientes com diagnóstico de EM ou NMOSD quando da remissão, com imunomoduladores na tentativa de evitar novos surtos. Os imunomoduladores aprovados pela ANVISA para maiores de dois anos de idade são o interferon beta e o acetato de glatirâmer. No caso de NMOSD, a azatioprina também é aprovada para a população pediátrica como

imunossupressor durante a remissão (8). Há relatos da utilização de micofenolato mofetila, um imunossupressor com boa eficácia e tolerância em transplante de órgãos, para tratamento de NMOSD e EM em adultos (54). Seu mecanismo de ação é a inibição da iosina monofosfato desigrogenase, que inibe a síntese do nucleotídeo guanossina e conseqüentemente inibe a proliferação de linfócitos T e B (55).

O imunossupressor ciclofosfamida é um agente quimioterápico alcalino derivado do nitrogênio mostarda que se liga ao DNA e interfere na mitose e na replicação celular, possuindo assim um componente de imunossupressão e imunorregulação com a supressão da imunidade humoral e celular (56). É considerado tratamento de segunda linha para EMP, pois apesar de sua eficácia comprovada, há um risco maior de câncer de bexiga, além de leucemia e infertilidade (57).

Segundo a diretriz do Ministério da Saúde: “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” (8).

Ultimamente, o conceito de NEDA (*No Evidence of Disease Activity*) em pediatria está em discussão. Os objetivos para o NEDA são pesquisar tratamentos precoces mais eficazes a fim de diminuir a atividade da doença e assim evitar sua evolução, além de buscar métodos laboratoriais e de imagem que sejam sinalizadores antes do surto e da evolução silenciosa da EMP (58).

V.g-Imunofisiopatologia da DDA

V.g.I-Histologia básica do SNC

As células que compõem o SNC são os neurônios e as células da glia. Cabe ao neurônio a função de receber, transmitir e processar estímulos. Seus prolongamentos, os axônios, são responsáveis pela transmissão do impulso nervoso para diferentes células do corpo. Os axônios são envolvidos por uma bainha de mielina, produzida pelos oligodendrócitos, um tipo celular da glia, com a função de isolante elétrico.

As células que constituem a glia são:

- Células endimárias – revestem os ventrículos e o canal central da medula espinhal. Podem apresentar cílios para facilitar a movimentação do LCR;
- Oligodendrócitos – Produtores da bainha de mielina, localizam-se em volta do axônio no SNC;
- Astrócitos – Apresentam-se principalmente em torno do corpo celular do neurônio. Possuem a função de sustentação do arcabouço celular, além de promover o controle da composição iônica e molecular do ambiente extracelular. Os astrócitos ligam os neurônios aos capilares vasculares e a pia-máter através de seus prolongamentos chamados pés vasculares. Esses pés promovem a transferência de moléculas e íons do sangue para os neurônios. Eles ainda podem influenciar na atividade e sobrevivência dos neurônios, pois controlam o ambiente extracelular, absorvem neurotransmissores excedentes e produzem moléculas neuroativas, além de se comunicarem entre si e com os oligodendrócitos através de citocinas.

- Micróglia - São pequenas, alongadas e representam o sistema fagocitário no SNC, participando da inflamação e reparo do SNC. Quando ativadas se transformam em macrófagos, tornam-se fagocitárias e apresentadoras de antígenos (APC), além de secretar diversas citocinas para regular o processo inflamatório e remover restos celulares no caso de lesão no SNC (59). A micróglia é responsável pela homeostase do SNC e provavelmente o maestro da inflamação nas DDA (59).

V.g.II- Componentes do Sistema Imune

Para que o organismo se defenda de patógenos, o sistema imune possui dois tipos de resposta: uma inicial chamada imunidade inata e uma tardia chamada imunidade adaptativa (13).

A resposta inicial, também conhecida como inata, natural ou nativa, é a primeira resposta aos microrganismos, constituída de mecanismos de defesa celulares e bioquímicos já presentes antes de qualquer infecção, e tem o papel de responder rapidamente através da reação aos produtos produzidos pelo agressor e às células lesionadas, independentemente do número de vezes que o organismo foi exposto. Os mecanismos da imunidade inata, anteriormente ditos inespecíficos, atualmente são capazes de reconhecer padrões moleculares comuns a grupos de microrganismos relacionados (PAMPs). Porém, esses padrões moleculares muitas vezes podem não distinguir pequenas diferenças entre microrganismos (13).

São componentes da imunidade inata:

- Barreiras físicas e químicas como epitélio e agentes microbianos produzidos pelo epitélio;
- Células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos;

- Células dendríticas;
- Células assassinas naturais (NK);
- Proteínas sanguíneas como mediadores inflamatórios e o sistema complemento.

A resposta imunológica chamada tardia, adaptativa, adquirida ou específica é um conjunto de respostas imunes que ao serem estimuladas pelos agentes agressores aumentam em sua magnitude e em sua capacidade defensiva a cada exposição a um patógeno particular (específico). O sistema imune, nesse caso, pode reconhecer e reagir a substâncias microbianas e não-microbianas. O sistema imune adaptativo possui como características: **a especificidade** para o reconhecimento das diferentes substâncias; **especialização** para gerar respostas ótimas para cada microrganismo; **a memória**, ou seja, a habilidade de responder mais intensamente em múltiplas exposições ao mesmo microrganismo; **a diversidade**, ou seja, o reconhecimento de uma grande quantidade de antígenos; **a expansão clonal** com o aumento do número de linfócitos para combater os microrganismos; e **a contração e hemostasia** que permitem a recuperação do sistema imune para posteriores respostas aos antígenos encontrados e a não reatividade ao próprio, prevenindo a lesão ao próprio organismo durante a resposta aos antígenos, fenômeno chamado de tolerância. Fazem parte da imunidade adaptativa os linfócitos e os anticorpos por eles produzidos (13).

Chamam-se antígenos todas as substâncias estranhas que induzem respostas imunes específicas e os fragmentos específicos de cada antígeno, reconhecidos pelos receptores do sistema imune adaptativo, de epítomos.

Abaixo está um esquema retirado do livro texto de imunologia Abbas que sintetiza os tipos de imunidade (13).

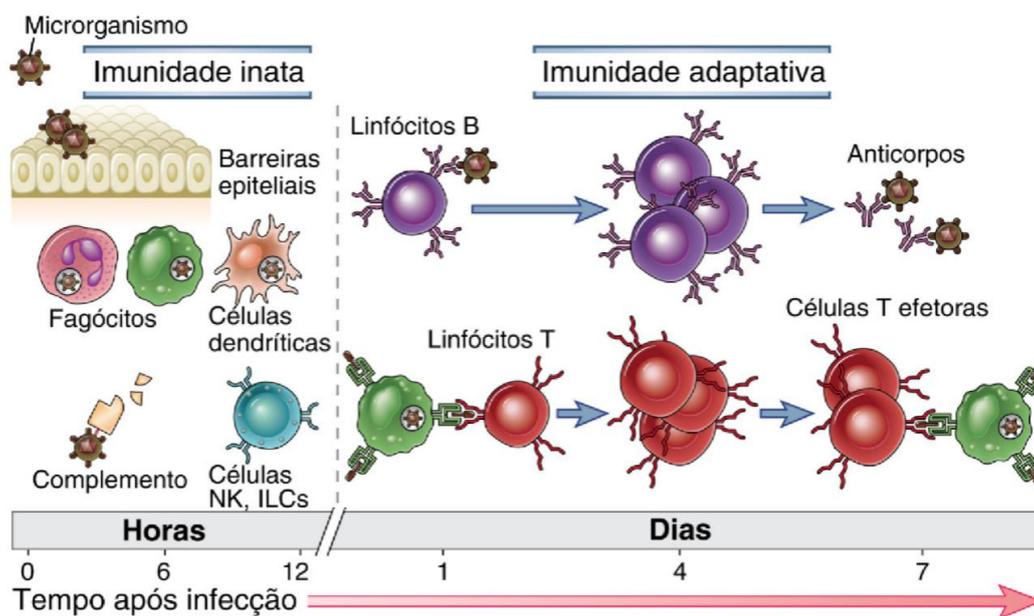


Figura 1: Imunidade inata e adaptativa. Os mecanismos da imunidade inata fornecem a defesa inicial contra infecções. As respostas imunes adaptativas se desenvolvem mais tarde e necessitam de ativação de linfócitos. ILC: célula linfóide inata; NK: Natural Killer. Retirado de Abbas, *Imunologia celular e molecular*, 8ª edição (13)

A resposta imune adaptativa é dividida didaticamente em duas respostas: humoral e celular. A humoral é mediada por anticorpos produzidos pelos linfócitos B que neutralizam e ajudam a eliminar os microrganismos. A imunidade celular é mediada por linfócitos T que promovem a destruição de microrganismos intracelulares alojados em fagócitos ou induzem a morte de células infectadas para eliminar reservatórios de infecção. Os linfócitos T ajudam também no recrutamento de leucócitos para destruir patógenos e auxiliam as células B na produção de anticorpos (13).

Os linfócitos B são capazes de reconhecer antígenos extracelulares solúveis e na superfície das células, posteriormente se diferenciando em

plasmócitos que produzem e secretam anticorpos, ou seja, são os mediadores centrais da resposta humoral. Os linfócitos T reconhecem antígenos apenas quando apresentados na superfície de células apresentadoras de antígenos (APC) e, posteriormente, ajudam os fagócitos a destruir os microrganismos intracelulares, ou ajudam linfócitos B na maturação funcional, ou ainda assumem a função de exterminadores de células infectadas, as matando. As populações de linfócitos T são funcionalmente distintas. São elas: células T auxiliares (CD4+) e linfócitos T citotóxicos (CD8+). A partir do estímulo antigênico, as células T auxiliares secretam citocinas que funcionam como “moléculas mensageiras” do sistema imune, atuando tanto na imunidade inata como na adaptativa. As citocinas produzidas pelos linfócitos T auxiliares estimulam a proliferação, o recrutamento e diferenciação das células T, assim como outros grupos celulares como linfócitos B, macrófagos, entre outros leucócitos. Os linfócitos T citotóxicos matam células infectadas por vírus e outros microrganismos intracelulares. Há também os linfócitos que inibem as respostas inflamatórias chamados linfócitos T regulatórios (Treg) (13).

Como mencionado anteriormente, para que ocorra o início da resposta adaptativa há necessidade da captura dos antígenos e a apresentação desses aos linfócitos específicos. Quem faz essa apresentação são as células apresentadoras de antígeno (APC), sendo as células dendríticas, atualmente, consideradas as iniciadoras da resposta imune, responsáveis pela captura dos antígenos, transporte aos órgãos linfoides secundários e apresentação aos linfócitos T virgens (13).

V.g.III- Citocinas e quimiocinas

As citocinas são um grupo de proteínas com diversas funções que regulam e coordenam atividades das células do sistema imune inato e adaptativo. As células do sistema imune também produzem citocinas e expressam receptores específicos para várias delas. A nomenclatura das citocinas ainda não alcançou uma uniformidade adequada. Inicialmente as citocinas que eram responsáveis pela comunicação entre leucócitos eram chamadas de interleucinas, seguidas de um número ordinal (por exemplo: interleucina-10 ou IL-10). No entanto, outras interleucinas por terem sido descobertas a partir de sua função biológica detém o nome associado à sua função (por exemplo: fator de necrose tumoral ou TNF). As citocinas possuem várias funções como o crescimento e diferenciação das células imunes, ativação de funções efetoras de linfócitos e fagócitos, movimentação direcionada das células para o sistema circulatório e dele para os tecidos. Para essa última função, o subgrupo de citocinas que regulam a migração direcionada das células para o sistema circulatório e para os tecidos é chamado de quimiocinas.

Quando ocorre uma agressão tecidual, uma das primeiras respostas do sistema inato é a produção de citocinas que atuarão na resposta inflamatória aguda. São geralmente produzidas por macrófagos teciduais, células dendríticas, células epiteliais e endoteliais, atuando de forma parácrina e ou autócrina, ou seja, em células que estão próximas a sua produção ou nas próprias células produtoras, mantendo um espectro de ação local. Quando ocorre uma infecção grave pode haver uma produção excessiva de citocinas promovendo também sua ação sistêmica via circulação, chamada ação endócrina. As citocinas podem apresentar ações semelhantes e sobrepostas,

assim como ações únicas, podendo estimular e amplificar como uma cascata inflamatória a produção de outras citocinas. As citocinas da imunidade inata podem induzir inflamação, inibir a replicação viral, promover a resposta de células T, limitando respostas imunes inatas, isto é, atuando pró e anti-inflamatoriamente (13).

Na imunidade adaptativa, as citocinas possuem um papel fundamental de interligar os tipos celulares diversos. As células T auxiliares CD4⁺ produzem a maior quantidade e variedade de citocinas, porém as células TCD8⁺ e células B também produzem citocinas que desempenham papel importante durante a resposta imune. Ocorre também produção de citocinas pelas APC e células dendríticas, podendo assim atuar na imunidade adaptativa e diversificar a resposta adaptativa de forma parácrina. Elas estão envolvidas na proliferação e diferenciação de células T e B e nas funções efetoras de células T CD4⁺ em suas subdivisões Th1, Th2, Th17 e Treg conforme a ação de suas citocinas.

Todas as respostas imunes descritas anteriormente estão envolvidas na fisiopatologia das doenças autoimunes como as DDA. Abaixo, é apresentada a figura 3 demonstrando a diferenciação das células T efetoras conforme as citocinas produzidas e seu papel em algumas doenças mediadas pelo sistema imune (13).

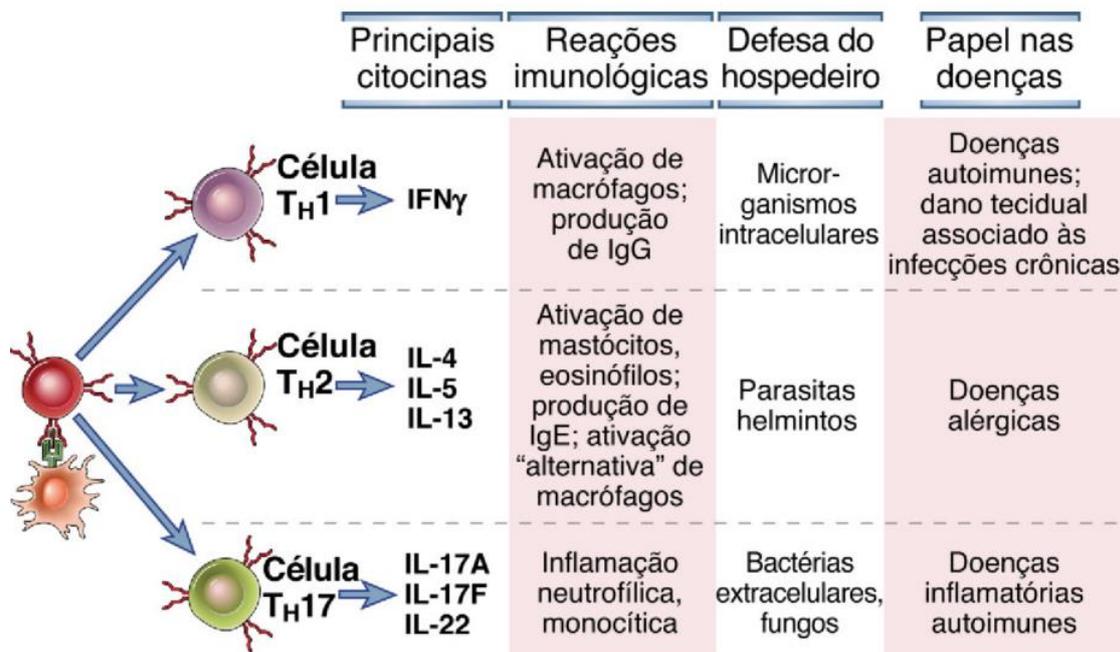


Figura 2: Principais citocinas, reações imunológicas, defesa de hospedeiro e papel nas doenças dos subgrupos TH1, TH2, TH17 e subgrupos de células T CD4⁺ e T auxiliares. As células T CD4⁺ podem diferenciar-se em subconjuntos distintos de células efetoras em resposta a antígenos, coestimuladores e citocinas. IFN γ : interferon gama; IL: interleucina. Extraído de Abbas, imunidade celular e moléculas, 8ª edição (13)

V.g.IV-Tolerância e autoimunidade

Durante o desenvolvimento dos linfócitos nos órgãos linfoides centrais, o rearranjo gênico ocorre ao acaso, podendo gerar linfócitos com afinidade a antígenos próprios (ou autoantígenos). Esses linfócitos entram num "controle de qualidade" sendo removidos ou retidos por vários mecanismos, evitando assim que o indivíduo não seja atacado por suas próprias células. A esse mecanismo de proteção dá-se o nome de tolerância. Os autoantígenos podem levar a ativação da resposta celular e humoral. Quando a resposta humoral autoimune é disparada, a produção de autoanticorpos contra esse antígeno próprio é responsável pela evolução clínica da doença. O controle dos clones autorreativos pode ocorrer através de dois mecanismos conhecidos: a tolerância central, dentro dos órgãos linfoides centrais, quando o linfócito ainda virgem

entra em contato com o antígeno e produz um sinal negativo causando sua morte ou inativação; e a tolerância periférica ou por excesso de antígenos, que ocorre fora dos órgãos linfoides centrais e é realizada por células da periferia, células da imunidade inata ou por um meio com uma concentração alta e sustentada de antígenos, podendo tornar mesmos os linfócitos maduros na periferia, tolerantes a esses autoantígenos. Os mecanismos principais de tolerância periférica são a anergia (falta de resposta funcional), supressão pelas células Treg, indução do desenvolvimento das células Treg (em vez de desenvolvimento de células T efetoras) e deleção de linfócitos do repertório devido a morte celular induzida pela ativação. Durante um período sem infecção, os sinais que permitem a ativação da resposta imune adaptativa (citocinas entre outros) não são produzidas. O contato de um linfócito virgem com um autoantígeno tende a levar a um sinal negativo, promovendo a inativação, sendo diferente da ausência de sinal, ou pode levar ao desenvolvimento de linfócitos reguladores, os quais suprimem o desenvolvimento de respostas efetoras de linfócitos autoreativos que podem danificar o tecido. A doença autoimune só ocorre quando há falha de todos esses mecanismos de controle e acarretam uma resposta sustentada contra o próprio. Quando há falha na tolerância imunológica aos autoantígenos, ocorre uma cascata de reações imunológicas promovendo uma resposta imune celular e/ou humoral, e conseqüentemente causa doenças autoimunes (60).

A autoimunidade resulta da combinação de algumas das três aberrações imunológicas principais:

- Tolerância ou regulação defeituosas;
- Apresentação anormal de autoantígenos;

- Inflamação ou resposta imunológica inata inicial.

As células T parecem ter um papel fundamental na autoimunidade. As células T auxiliares são reguladores-chave de todas as respostas imunológicas às proteínas, e muitos autoantígenos nas doenças autoimunes são proteínas. Além disso, há uma relação entre as doenças autoimunes e o complexo principal de histocompatibilidade humano (HLA) que é geneticamente determinado (61). A função das moléculas de HLA é apresentar os antígenos peptídicos para as células T, expressos na membrana de todas as células nucleadas do nosso organismo, no caso do HLA classe I, e nas células apresentadoras de antígeno, no caso de HLA de classe II. A maioria das doenças autoimunes tem causa poligênica, numerosos genes contribuem para seu desenvolvimento. Acredita-se além dos genes HLA, outros genes contribuam para influenciar a seleção ou regulação de linfócitos autorreativos, como polimorfismos não HLA associados a autoimunidade.(62)

Dentre os genes não HLA, já foi descrito na literatura um polimorfismo no gene da cadeia alfa do receptor de IL-2 associado ao desenvolvimento de EM num estudo populacional de sequenciamento genoma completo. Polimorfismos nos genes já foram associados a diferentes formas de EM (63) .

Infecções virais e bacterianas podem contribuir para o desenvolvimento e exacerbação da autoimunidade. Em pacientes e em alguns modelos animais, o surgimento das doenças autoimunes frequentemente está associado a infecções ou é precedido pelas mesmas. O microrganismo infeccioso pode não estar presente em lesões e nem mesmo ser detectável no indivíduo quando a autoimunidade se desenvolve. Portanto, as lesões da autoimunidade não se devem ao agente infeccioso por si só, mas resultam das respostas imunológicas

do indivíduo, que podem ser disparadas ou desreguladas pelo microrganismo (64).

As infecções podem predispor à autoimunidade através de diversos mecanismos, incluindo expressão elevada de moléculas coestimuladoras nas células da imunidade inata presente nos tecidos e potenciais reações cruzadas entre antígenos de microrganismos e autoantígenos, chamado de mimetismo molecular. A microbiota intestinal e cutânea pode influenciar o desenvolvimento de doenças autoimunes, tendo sido demonstrado experimentalmente que a colonização por microrganismos comensais parece ter efeitos significativos na maturação e ativação do sistema imunológico (13).

Entender melhor o mecanismo de autotolerância e autoimunidade é a chave para o entendimento da imunofisiopatologia das DDA.

V.g.V- Imunopatologia das DDA

As DDA são consideradas doenças autoimunes órgão-específicas que acometem o SNC. Classicamente descritas como mediadas por células T com uma resposta autoimune destrutiva contra vários antígenos cerebrais, incluindo a proteína básica de mielina (MPB), proteína proteolipídica (PLP) e a glicoproteína da mielina de oligodendrócito (MOG), as DDA causam a desmielinização dos axônios e conseqüentemente promovem a apresentação clínica conhecida e já descrita (60). Há poucos estudos específicos sobre fisiopatologia em DDA principalmente em pediatria devido às particularidades da faixa etária. Tanto o sistema imune quanto o SNC estão em desenvolvimento e, apesar do repertório imune adaptativo já estar estabelecido e ser bastante amadurecido desde o nascimento, os repertórios imunes continuam se expandindo e maturando (65).

Há uma exposição intensiva durante o período de infância até a escolaridade a vários microrganismos além de exposição vacinal. Infecções recorrentes podem não só estimular o sistema imune, mas também afetar a integridade da barreira hematoencefálica, aumentando a exposição de mediadores periféricos para o SNC. A maior parte das síndromes inflamatórias do SNC causadas por infecções ou pós-infecciosas ocorrem em pacientes pediátricos (49).

Apesar de apresentar um componente inflamatório mais exacerbado, as manifestações neurológicas nas DDA em pediatria costumam não deixar sequelas, parte pelo componente mais plástico do SNC em desenvolvimento. Outra questão a se pensar é a terapêutica em EMP e NMOSD particularmente. A falta de informações de fisiopatologia em pediatria leva a dúvidas em relação a que melhores tratamentos devem ser instituídos, uma vez que o SNC e o sistema imune ainda estão em desenvolvimento(66).

Deve ser levar em conta também o potencial impacto das terapias imunes vigentes, em indivíduos jovens com timo e medula óssea em franca atividade proliferativa e geradora de diversidade imunológica, fator determinante para a resposta adequada aos diversos agentes externos aos quais essa população está exposta (52). Portanto, é de suma importância o conhecimento dos mecanismos imunofisiopatológicos da DDA na faixa etária pediátrica para melhor diagnóstico e melhor terapêutica nesses casos.

A maior parte dos estudos sobre mecanismos imunológicos de desmielinização foram realizados em EM. No entanto, a causa exata do desencadeamento da EM e da sua variabilidade clínica ainda é desconhecida. Uma das hipóteses defende que indivíduos geneticamente suscetíveis podem

desenvolver a doença em determinadas condições do meio ambiente e que essas condições influenciariam a penetrância da doença (67) Por exemplo, polimorfismos de genes não-HLA responsáveis pelos receptores de interleucinas IL-2 e IL-7 são responsáveis por mecanismos de tolerância e sua disfunção pode acarretar mudança de resposta a citocina, disfunção na produção de citocinas e proliferação homeostática em pacientes com predisposição a EM (68). Em contrapartida, fatores ambientais apresentam potencial relação com a variabilidade da EM como vitamina D, infecção por citomegalovírus, distúrbio do ciclo circadiano, tabagismo e infecção pelo vírus Epstein-Barr (69,70). A associação entre os mecanismos de predisposição genética e o meio ambiente desencadeariam a reação inflamatória em cadeia e conseqüentemente a desmielinização.

O modelo experimental mais estudado para DDA é em camundongos que desenvolveram uma encefalomielite autoimune experimental, mimetizando uma clínica semelhante a EM (60). Os estudos com camundongos apontam para um modelo extrínseco fisiopatológico, periférico, onde por mimetismo molecular, ocorre a ativação ou coexpressão de receptores de células T com diferentes especificidades. As células T autorreativas são ativadas na periferia e migram para o SNC em companhia de células B e monócitos. Em contato com o antígeno ocorre a produção de células CD4+ Th1 e Th17 nos linfonodos. Essas células entram na circulação, migram para o SNC e rompem a barreira hematoencefálica ou a barreira liquórica no plexo coroide. Em seguida, são reativadas no SNC pelas APCs, que incluem as células dendríticas CD11c+, aumentando a resposta inflamatória, através do recrutamento de mais células inflamatórias que ativam

mais células T dentro do SNC e, assim, perpetuam a inflamação. As células Th1 e Th17 são as mais implicadas nesse modelo experimental de doença (71).

Ainda nesse modelo experimental, as lesões desmielinizantes na substância branca e cinzenta apresentam um maior número de células T CD8+ que CD4+ e sua presença está associada a lesão axonal. Em um outro modelo, antígenos derivados de astrócitos não mielinizados podem desencadear a forma remitente recorrente da doença em camundongos. O modelo foi modulado por células B e por vírus sugerindo que as interações de várias células e meio ambiente pode contribuir para o caráter heterogêneo da doença. Em humanos, cerca de um quarto das células T CD8+ presentes nas lesões desmielinizantes podem produzir IL-17 (72).

Na EM em adultos, conforme a progressão da doença, há o aumento do número de células B autorreativas. Elas podem ser encontradas nas meninges, parênquima, líquido e células intratecais. As células B produzem anticorpos encontrados no LCR que possuem um valor diagnóstico. As meninges nos pacientes com a forma secundariamente progressiva possuem estruturas linfoides terciárias compostas por células plasmáticas, células B, T e células foliculares demonstrando o caráter crônico da doença. Em pacientes com a forma primariamente progressiva, as meninges apresentam um infiltrado inflamatório importante, porém sem estruturas linfoides (73)

Estudos com clones de células B em pacientes com EM indicam que as células B que já entraram em contato com os antígenos podem se maturar nos linfonodos cervicais antes de migrarem para o SNC (74).

Outra hipótese levanta a possibilidade que a presença das células T e B autorreativas podem estar associadas a disfunção de células T regulatórias (Treg) (75). Um estudo mostrou que pacientes com EM associado ao polimorfismo dos complexos de histocompatibilidade de classe II em humanos (HLA classe II) podem alterar a seleção tímica levando as células T regulatórias naturais liberadas a suprimir inadequadamente as células T efetoras (76). Já a disfunção das células Treg periféricas podem estar indiretamente ligada a desregulação das APC, como demonstrado no modelo em camundongos (67). Há relatos de diminuição da frequência e da capacidade supressiva das células Treg, além de uma frequência anormal em subpopulações celulares de Treg específicas em sangue periférico de pacientes com EM comparados a controles (76). Portanto, uma desregulação no mecanismo efetor-regulatório das células parece estar presente na fisiopatologia da EM, culminando com o aparecimento de células imunes autorreativas capazes de se infiltrar e promover lesão no SNC. A tentativa de controle dessa desregulação pelos fármacos empregados no tratamento parece resolver parcialmente o problema, porém não é o suficiente para, nos estágios mais avançados de doença, prevenir a neurodegeneração (67).

Finalmente o processo da neurodegeneração ocorre como uma consequência de eventos em neurônios e axônios incluindo estresse oxidativo, deficiências energéticas, desbalanços iônicos, a falência dos mecanismos de neuroproteção e regeneração, tendo como combustível principal a inflamação crônica do SNC. As células do sistema imune adaptativo podem contribuir para a inflamação crônica em EM com o ataque direto às células e componentes do SNC, demonstrado com a presença de focos imunoproliferativos nesse sistema.

Porém está cada vez mais estabelecido que as células da micróglia e os astrócitos podem também produzir uma gama de mediadores inflamatórios neurotóxicos como citocinas, quimiocinas que promovem a lesão neuroaxonal e a neurodegeneração (77).

V.g.V.I-As citocinas na fisiopatologia das DDA

Como dito anteriormente, as citocinas são pequenas proteínas que permitem a comunicação das células imunes entre si e entre o meio que estão localizadas. Há descrições de mais de 400 citocinas e suas funções são múltiplas, incluindo proliferação celular, migração, fibrose, reparo, angiogênese, imunidade e inflamação (78). As citocinas desempenham um papel importante na fisiopatologia das DDA. Elas regulam a entrada das células imunes em diferentes áreas do SNC, levando a manifestação clínica variável nos modelos animais (71). Em pacientes com EM e em modelos de camundongos, os padrões de expressão de citocinas podem se encontrar exacerbados no sangue periférico e no SNC, levando à teoria de que o balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias regula o desenvolvimento e a progressão do dano tecidual e, conseqüentemente, da doença. Estudos em adultos já demonstraram que as citocinas pró-inflamatórias no sangue de pacientes com EM encontram-se elevadas em comparação aos controles, levando a crer que as citocinas podem ser um marcador de atividade de doença (79). As células CD4⁺ virgens entram em contato com as APCs, que através das moléculas co-estimulatórias e sinalização de citocinas, realizarão a maturação funcional das células T efetoras. As células T efetoras são consideradas os principais maestros na patogênese da EM. A partir desse momento, essas células são produtoras de altas concentrações de citocinas específicas que ativam a diferenciação de novas

células T CD4 auxiliaadoras nos quatro subtipos funcionais mais reportados na literatura: Th1, Th2, Th17 e Treg. O balanço no número e atividade dessas células será responsável pela promoção da cascata inflamatória e posterior desmielinização (79). Outros subtipos funcionais menos relatados e mais recentes na literatura são os subtipos Th9 e Th22. Todos os subtipos celulares produzem um perfil específico de citocinas e desempenham papéis pró ou anti-inflamatório (80).

As células Th1 são consideradas as principais envolvidas no mecanismo da EM. São definidas por sua produção de IL-2 e INF- γ , mas também produzem outras citocinas como TNF, linfotaxina e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). A INF- γ , citocina mais conhecida associada com a fisiopatologia de doenças autoimunes, é uma citocina pró-inflamatória potente que aumenta a expressão de receptores do tipo Toll (TLR), responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs pelas células do sistema imune inato. Ela promove a mudança de classe de imunoglobulinas para IgG; aumenta a apresentação de antígenos através do HLA de classe 1 e 2 (MHC); induz a secreção de quimiocinas; e ativação de funções fagocíticas e microbicida de macrófagos. Os relatos de níveis elevados de INF- γ e TNF no sangue de pacientes com DDA corroboram para essa associação entre o fenótipo Th1 e a imunopatologia no SNC (81).

As células Th2, inicialmente mais associadas a quadros alérgicos, são conhecidas pela produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13. A citocina IL-4 é comumente associada ao perfil Th2, porém não é uma citocina exclusiva dessas células e também é produzida por mastócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos T $\gamma\delta$. Em doenças autoimunes, linfócitos Th2 e, conseqüentemente, as citocinas

desse perfil, são classificadas como anti-inflamatórias por sua habilidade de suprimir doenças autoimunes mediadas por células Th1 (80). As células Th2 já foram encontradas próximas às lesões desmielinizantes em atividade, porém estes estudos apontam que suas citocinas estão implicadas positivamente na cascata inflamatória e, portanto, contribuem para a imunopatologia das DDA (82). Em modelos de camundongos, ocorre uma mudança de padrão de citocinas de Th1 para Th2 com a produção de anticorpos anti-MOG, concluindo que a indução de resposta Th2, nesse caso, pode exacerbar alguns aspectos da fase efetora da autoimunidade mediada por anticorpos, mas levando a uma doença clinicamente menos grave (83).

Além das citocinas citadas anteriormente, a IL-5 e IL-13 também são produzidas por células Th2. A IL-5 estimula a produção de anticorpos pela célula B e aumenta a proliferação e diferenciação de precursores de eosinófilos. Assim como a IL-4, a citocina IL-13 além de ser produzida por células Th2, pode ser produzida por células TCD8+, masócitos, células dendríticas e eosinófilos. Sua função é inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2 e TNF por monócitos, mas também funcionam como um coestimulador de células B facilitando sua ativação e maturação. Acredita-se que não há uma função direta e relevante da IL-5 na patogênese da EM. No entanto, estudos em humanos relatam menor frequência de surtos associados ao aumento de IL-5 no sangue de pacientes com EM tratados com acetato de glatiramer (84). Estudos de células TCD4+ em pacientes com EM demonstram que na fase de surto há um aumento da produção de IL-13 no sangue desses pacientes. Quando o paciente entra em remissão, os níveis de IL-13 voltam para seu nível basal, sugerindo que IL-13 facilita a migração de células inflamatórias para o SNC

através de dois mecanismos diferentes: o aumento da expressão da molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), que media a adesão e migração das células inflamatórias para dentro do SNC; e a desmielinização via produção de autoanticorpos por células B (85).

As células Th17 produzem seis tipos diferentes de IL-17 (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (ou IL-25) e IL-17F), sendo a IL-17A e IL-17F com alta homologia. Localizam-se em regiões próximas do mesmo cromossomo e compartilham os padrões de expressão nessas células (86). São mediadores inflamatórios potentes que atuam em um amplo espectro de condições infecciosas, inflamatórias e autoimunes. O maior produtor de IL-17 é a célula T helper CD4+, apesar de outros tipos celulares produzirem em menor escala, como células $\gamma\delta$, NK, NKT e macrófagos, entre outros. As células T secretoras de IL-17 são consideradas atualmente as mediadoras-chave da autoimunidade. A família IL-17 tem como funções: recrutamento de neutrófilos; ativação de células inatas; amplificação das funções de célula B; indução de liberação de outras citocinas como TNF, GM-CSF e IL-1 β ; indução da expressão de quimiocinas e outros mediadores inflamatórios como ICAM-1, prostaglandina E2(PGE2); e promoção de dano tecidual através da indução de metaloproteinases de matriz (MMPs) e peptídeos antimicrobianos. Todas essas funções interagem entre si, causando um *feedback* positivo com aumento da produção de IL-17, mantendo, portanto, a perpetuação da inflamação. Há descrições da importância da IL-17 na encefalomielite aguda experimental (87). Além disso, *Guerreiro Garcia* demonstrou em seu artigo que pacientes com EM, conforme a evolução da doença, apresentam maiores níveis de IL-17 no sangue. Acredita-se que a contribuição de IL-17 para a fisiopatologia da EM seja através

da transmigração dos linfócitos CD4+ através do endotélio da BHE por ruptura das junções oclusivas do endotélio vascular e através da amplificação da citotoxicidade do glutamato como um mecanismo efetor de lesão (88). Além de IL-17, as células Th17 produzem IL-21, IL-22, IL-25 e IL-26.

As células T regulatórias (Tregs) são um subconjunto de células Th que possuem a função de inibir a função efetora dos outros subtipos Th. Tregs expressam o fator de transcrição FoxP3, que é crítico para a diferenciação, sobrevivência e funções reguladoras dessas células. Numerosos estudos identificaram Tregs como imunorreguladores importantes em muitas doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo asma, EM e diabetes tipo I(80). Vários mecanismos de supressão imunomediada por Treg foram identificados, incluindo: a secreção de citocinas anti-inflamatórias, expressão de receptores inibitórios e consumo de citocinas. As duas citocinas associadas principalmente com Tregs são IL-10 e TGF- β . O TGF- β também não é exclusivamente produzido pelas células Treg. Um outro subtipo de células T auxiliadora, Th3, e outras células do sistema imune (como células B, macrófagos e DCs), assim como células não imunes, também podem produzir esta citocina. In vivo, Tregs produtoras de TGF- β foram capazes de suprimir EAE, inibindo a resposta de células T autoimunes no SNC de camundongos (89).

A IL-10 é expressa por células do sistema imune inato e adaptativo incluindo células T CD4 + e CD8 +, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos e neutrófilos. Os efeitos imunossupressores da IL-10 são em grande parte mediados por seu impacto nas células apresentadoras de antígeno (APCs), minimizam a expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86 e CD28). Além disso, reduzem a liberação de

citocinas pró-inflamatórias por mastócitos e macrófagos, bem como a supressão de sua função e ativação.

As quimiocinas são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam o movimento dos leucócitos e regulam a migração dos leucócitos do sangue para os tecidos. As quimiocinas das subfamílias CC e CXC são produzidas pelos leucócitos e por vários tipos de células teciduais, tais como células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. Em muitas destas células, a secreção das quimiocinas é induzida pelo reconhecimento dos microrganismos através de vários receptores celulares do sistema imune inato, ou ainda por citocinas inflamatórias presentes no foco inflamatório. Dentre as citocinas inflamatórias que induzem a produção de quimiocinas, TNF, IL-1 e IL-17, são as mais relatadas na literatura (80).

Várias quimiocinas CC também são produzidas por células T ativadas, fornecendo uma ligação entre a imunidade adaptativa e o recrutamento de leucócitos inflamatórios. As quimiocinas são essenciais para o recrutamento de leucócitos circulantes dos vasos sanguíneos para os locais extravasculares, promovendo uma adesão aumentada dos leucócitos ao endotélio, sua transmigração pelo endotélio vascular e migração para o foco inflamatório nos tecidos infectados/inflamados.

Diante do cenário de diversas moléculas solúveis que regulam a fisiopatologia da EM, em diversos mecanismos celulares envolvidos no processo autoimune, a figura 3 apresenta um resumo das citocinas até o momento mais estudadas na fisiopatologia da EM e possibilidades terapêuticas com bloqueios de circuitos específicos mediado por essas moléculas. Esses tratamentos

poderão inclusive, num futuro próximo, serem combinados em pacientes com resposta parcial, visando a uma resposta clínica completa (78).

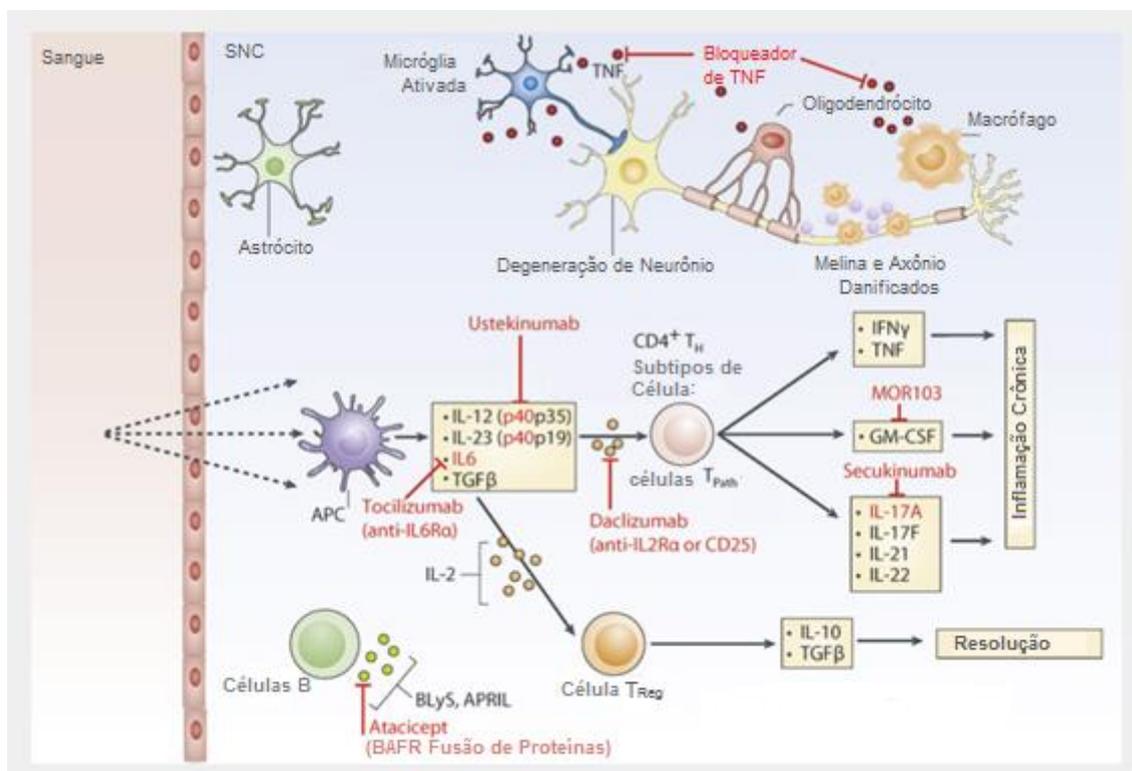


Figura 3: Principais citocinas na patogênese da esclerose múltipla. Em pacientes com EM e em seus modelos experimentais EAE, várias células imunes demonstraram produzir e reagir a citocinas pró e anti-inflamatórias no SNC inflamado. Os subconjuntos de células Th e Tregs são mostrados. Os potenciais alvos de citocinas para terapia e medicamentos são indicados em vermelho. O TNF α é expresso pelas células T, mas também pela microglia e pelos macrófagos. Seu bloqueio falhou nos ensaios clínicos de EM, possivelmente porque também possui efeitos homeostáticos no SNC e é importante para a remielinação. APC = célula apresentadora de antígeno; BAFF = fator de ativação de células B; SNC = sistema nervoso central; EAE = encefalomielite autoimune experimental; GM-CSF = fator estimulante das colônias de macrófagos de granulócitos; IFN = interferon; IL = interleucina; EM = Esclerose Múltipla; TPath = subconjuntos de células T CD4 + patogênicas; Th = T helper cell; TNF- α = fator de necrose tumoral Treg = célula Treguladora. Retirado e adaptado de Schreiner e Becher, 2015 (78).

VI- METODOLOGIA

VI.a. Local do estudo

O Instituto Fernandes Figueira localizado na cidade do Rio de Janeiro é um hospital terciário que atende pacientes encaminhados de todo o Estado do

Rio de Janeiro. A coorte de pacientes com doenças desmielinizantes existe desde 2012 oriunda de projeto de pesquisa clínica. Nela são admitidos sujeitos de pesquisa com idade entre 2 e 18 anos de ambos os sexos com histórico de, no mínimo um surto de desmielinização. São acompanhados clinicamente, com exames complementares laboratoriais, neurofisiológicos e radiológicos e avaliações fonaudiológica e fisioterápica. Durante a permanência na coorte os pacientes foram classificados com os critérios internacionais de EM pediátrica e doenças correlatas. No caso de EMP ou NMOSD, foi instituído tratamento com imunomoduladores. No Brasil, os imunomoduladores aprovados para esta faixa etária são o interferon beta e o acetato de glatiramer. A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do IFF sob número CAAE: 02636212000005269, pertencente ao serviço de Neurologia Infantil do IFF (Anexo 1).

VI.b. Desenho de estudo

O presente estudo foi prospectivo, longitudinal e transversal, constituído de coorte em que os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de inclusão/exclusão mencionados abaixo. Ou seja, os pacientes pediátricos e adolescentes com idade de até 16 anos portadores de DDA definida clinicamente de acordo com consenso de 2013 no anexo 4 (7). O termo de consentimento de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa do IFF foi assinado pelo responsável da criança no momento da admissão, após as orientações sobre a pesquisa dadas pelo médico responsável (Anexo 2 e 3).

O protocolo de avaliação neurológica e coleta de sangue para dosagem de citocinas foi realizado em média de 90 em 90 dias. Coletas e avaliações extras

também foram realizadas no momento de surto. Os dados obtidos foram correlacionados com o diagnóstico clínico-radiológico. Os pacientes poderiam ser tratados com imunossupressores ou imunomoduladores, como interferon- α ou β e acetato de glatirâmer, de acordo com os protocolos descritos na literatura e autorizados pela ANVISA que são utilizados na rotina no Setor de Neurologia do IFF (anexo 6). Durante o seguimento os pacientes foram submetidos a exame neurológico evolutivo, EDSS (anexo 5) a cada três meses e exames de imagem inicialmente a cada seis meses.

VI.c. Casuística

- População do estudo

Todos os pacientes com idade entre 1 e 16 anos com diagnóstico de DDA, segundo as definições do consenso do International Pediatric MS Study Group (7) (anexo 4).

- Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico de DDA: CIS, ADEM, NMOSD e EMP, em qualquer fase da doença (surto e/ou remissão), admitidos no ambulatório de Neurologia Infantil específico para tratamento das DDA na infância ou nas Unidades de Internação do Instituto Nacional Fernandes Figueira.

- Critérios de exclusão

Pacientes com doenças genéticas ou congênitas, pacientes com comorbidades cardíacas, renais, gastrointestinais, hematológicas, pulmonares e reumatológicas prévias ao surto desmielinizante, ou pacientes com os diagnósticos apresentados na tabela 1.

- Cálculo amostral, período ou duração do projeto

A amostra foi baseada na frequência de atendimentos no ambulatório de neurologia infantil do IFF, que atualmente é de cinco pacientes/ano por ser um grupo de doenças raras. Desta forma, esperou-se conseguir no período de 48 meses dados de 20 pacientes com diagnóstico de DDA.

- Plano de recrutamento

Por ser um ambulatório especializado de referência para DDA, foram recrutados todos os pacientes encaminhados de outros serviços ou por demanda espontânea com diagnóstico sugestivo, bem como foram mantidos em acompanhamento pós-alta todos aqueles internados nas enfermarias ou na Unidade de Pacientes Graves e aqueles advindos da rede de Saúde Pública para tratamento de doenças desmielinizantes em fase aguda através do Sistema de Regulação do Estado (SISREG).

- Critérios para suspender ou encerrar o estudo ou retirar os participantes de pesquisa

O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) possui uma cláusula garantindo a saída do paciente em qualquer momento da pesquisa sem prejuízos para seu tratamento.

A confidencialidade dos participantes foi assegurada no TCLE.

Os pacientes que não seguissem o tratamento proposto ou que desistissem de participar da pesquisa foram considerados como perda.

VI.d. Materiais, Procedimentos e Técnicas

Os pacientes elegíveis para o estudo foram submetidos a:

-Anamnese dirigida, exame físico geral e exame neurológico com avaliação da Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (EDSS);

- Escala de Incapacidade para Esclerose Múltipla para pontuação das morbidades residuais dos surtos, para a definição terapêutica com imunomoduladores ou imunossupressores e reconhecimento da forma clínica evolutiva da doença (8,90).

- Dosagem de Citocinas

Amostras:

Amostras com 10mL de sangue periférico colhido em tubo com EDTA, foram mantidos em temperatura ambiente e processados num período inferior a 24 horas.

- Estocagem do plasma em ultrafreezer

Para separação da fase plasmática, os tubos foram centrifugados por 10 minutos à 500 g, e o plasma removido com auxílio de pipeta estéril e estocado em criotubos a uma temperatura de -80°C até o momento da análise.

-Dosagem de citocinas/quimiocinas plasmáticas

As amostras com 25 uL de alíquotas de plasma foram analisadas através de kit luminex “Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-Plex” para dosagem de 27 citocinas/quimiocinas de acordo com o protocolo do fabricante. As moléculas dosadas em pg/mL foram: FGF, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF- α e VEGF. A aquisição foi realizada no equipamento Luminex MagPix e análise no software Milliplex Analyst v5.1, ambos da empresa Millipore.

VI.e. Análises estatísticas

A comparação das citocinas entre os quatro grupos de DDA foram realizadas com auxílio do software SPSS versão 22, utilizando a análise de variância (ANOVA) unidirecional com o pós-teste de Tukey. Para a composição da árvore de decisão foi utilizado o algoritmo CRT (Árvores de Classificação e Regressão). O CRT divide os dados em segmentos que são tão homogêneos quanto possíveis com relação à variável dependente (91). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. A análise estatística foi realizada por estatístico da Pesquisa Clínica do IFF.

VI.f. Infraestrutura

A demanda de pacientes foi assegurada pelas características do IFF que dispõe de Centro de Referência de Doenças Desmielinizantes da Infância. A infraestrutura contou com a Plataforma Tecnológica Luminex disponível no Laboratório de Alta Complexidade do IFF (FIOCRUZ). O laboratório dispõe de *expertise* e equipamentos necessários para a realização dos ensaios e análises das dosagens de citocinas plasmáticas. Os materiais de consumo foram assegurados na rotina e através do fomento obtido do edital interno (PIP) do IFF. Todo o projeto, incluindo essa tese, conta com uma equipe de profissionais e pesquisadores com diferentes formações incluindo as áreas de imunologia, bioquímica, neuropediatria, fisioterapia, fonoaudiologia e radiologia, com experiência clínica e laboratorial.

VII. RESULTADOS

VII.a. População do estudo.

No período de novembro de 2012 a setembro de 2016 foram admitidos no ambulatório de DDA 30 pacientes. Destes, 18 atenderam os critérios de inclusão e 12 foram excluídos por apresentarem diagnósticos de doenças do SNC não-desmielinizantes (figura 4). Dos 18 pacientes incluídos, três foram considerados perda: um paciente com EMP que posteriormente apresentou tumor sólido do SNC e dois pacientes com CIS dos quais não foram obtidas amostras para análises de biomarcadores. Todas as análises de correlação clínica e biomarcadores apresentados a partir daqui são relativos a 15 casos de DDA, distribuídos em cinco ADEM, cinco EMP, três NMOSD e dois CIS, sendo todos os diagnósticos de exclusão, perda e inclusão listados na figura 4.

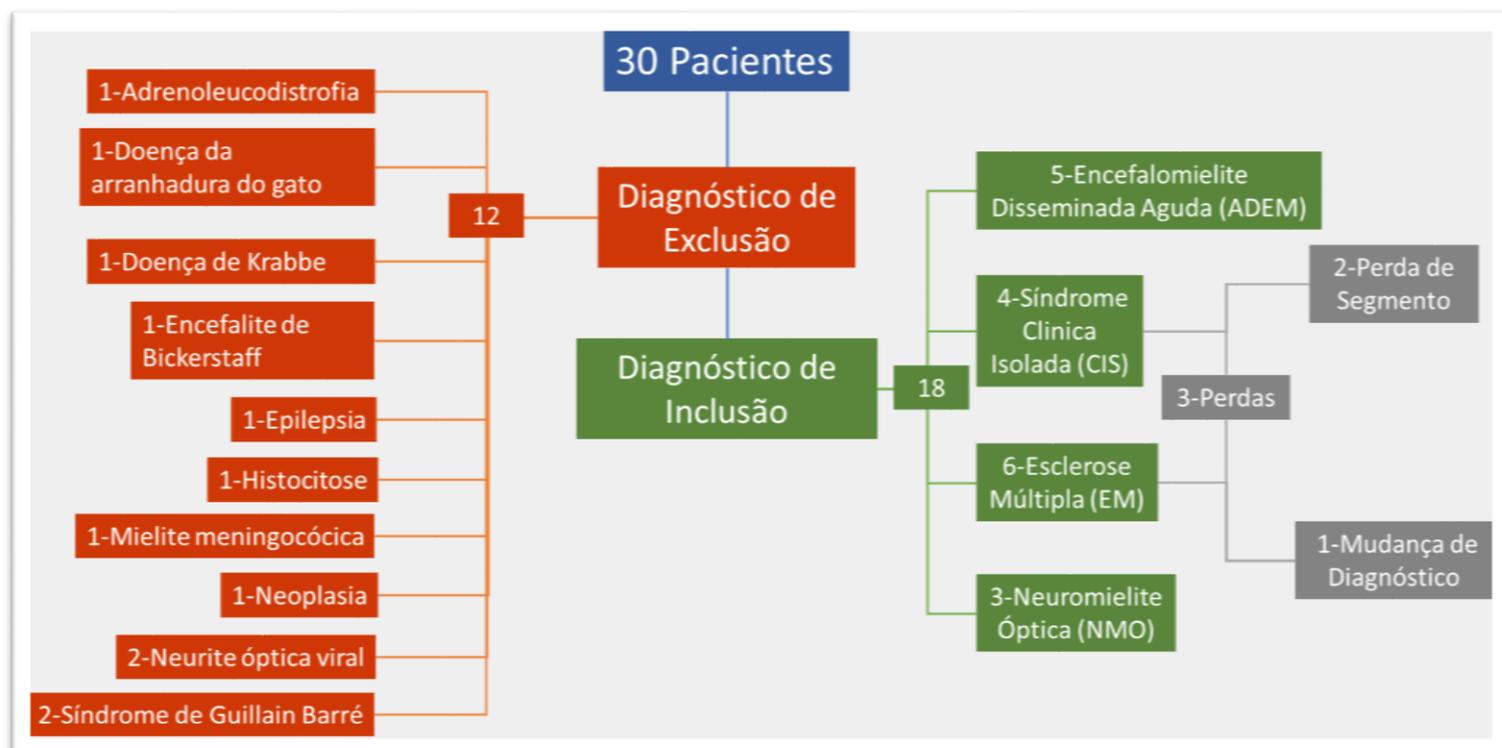


Figura 4: Fluxograma de admissão, aplicação de critérios de inclusão e exclusão e perdas para os pacientes avaliados no ambulatório de pesquisa de DDA do serviço de neuropediatria do IFF/FIOCRUZ no período de novembro de 2012 a setembro de 2016.

VII.b. Dados Demográficos da Coorte

Como mencionado no item material e métodos, os pacientes incluídos na coorte foram diagnosticados segundo os critérios de DDA e doenças correlatas em acordo com o consenso de 2012.

Para seu diagnóstico diferencial foram realizados exames complementares para análise de Antiaquaporina-4 no sangue em qualquer momento da doença e BOC no LCR quando da fase aguda. De acordo com a tabela 2, verifica-se que a maior frequência de casos são ADEM e EMP, ambos com 1/3 dos pacientes acompanhados, seguido pela NMOSD (20%) e CIS (13,3%). Ainda na tabela 2, observa-se que a mediana da idade de início dos sintomas dos pacientes incluídos é semelhante, sendo a EMP a doença que aparece mais tardiamente. A mediana de idade total dos pacientes no início dos sintomas foi 9 anos (3 a 14 anos de idade) Nossos resultados não mostram prevalência absoluta do sexo feminino nas 4 DDA, apenas ADEM e NMSO apresentaram incidência aumentada nesse sexo.

O EDSS oscilou entre 0 e 6,5. Os resultados se encontram resumidos na tabela 2 com suas respectivas medianas.

Tabela 2: Dados Demográficos da Coorte de pacientes avaliados no ambulatório de pesquisa de DDA do serviço de neuropediatria do IFF/FIOCRUZ no período de novembro de 2012 a setembro de 2016.

	ADEM		CIS		EMP		NMOSD	
Diagnóstico	33,3% (5/15)		13,3% (2/15)		33,3% (5/15)		20% (3/15)	
Sexo	2 M	3 F	2 M.	0 F.	3 M	2 F	0 M	3 F
Etnia	1B	3 P	1 N	2 B	3 B	2 N	1 P	2 N
Idade dos Sintomas	8 anos		8 anos		10 anos		9 anos	
EDSS Médio	1,56		0		1,25		1,36	
Surtos	3,0		1,0		3,0		3,0	
Testes Diagnóstico Diferencial								
Antiaquaporina 4 positiva	0/5		0/2		0/5		1/3	
Bandas Oligoclonais positivo	1/5		0/2		3/5		0/3	
Uso de Medicamentos								
Imunoglobulina	4/5		0		4/5		3/3	
Metilpredisona	4/5		2/2		5/5		3/3	
Acetato de Glatiramer	0		0		0		3/3	
INF-22	0		0		2/5		0	
INF-44	0		0		5/5		0	

Perfil da coorte de DDA no período de 2012/2016 sendo Esclerose Múltipla Pediátrica -**EMP**; Encefalomielite Aguda Disseminada - **ADEM**; Síndrome Clínica Isolada - **CIS** e Espectro de Neuromielite Ótica – **NMOSD**. Etnias **B**- Brancos, **P**- Pardos e **N**- Negros.

VII.c Evolução clínica e radiológica de um paciente com DDA: Relato de Caso

ALAPL, 9 anos de idade, sexo feminino, negra, natural do Rio de Janeiro e com bom desenvolvimento neuropsicomotor. Em maio de 2014 apresentou hemiparesia esquerda aguda. ALAPL negava alterações visuais, cefaléia, vômitos, febre ou história de vacinação recente. Foi realizada RM de crânio que evidenciou imagens ovais de diferentes tamanhos hipointensas em T1 e T2 com sinal de difusão restrito em FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) localizados nos lobos frontais, substância periventricular, ponte, tálamo direito, pedúnculos cerebelares e pedúnculo cerebral direito. (FLAIR). O tálamo apresentava impregnação tênue de contraste compatível com desmielinização. Evolutivamente apresentou melhora espontânea do quadro hemiparético sem tratamento farmacológico específico. Funções reumática e hematológica normais. Sorologia IgG e IgM para Epstein Barr virus positiva, com presença de BOC no LCR e anti aquaporina 4 negativa no sangue. A RM de controle em setembro de 2014 não revelou evolução radiológica da doença e apresentou redução de lesões maiores (Figura 5A). Em novembro de 2014, o exame neurológico detectou apenas uma dismetria discreta (EDSS = 1) com fundoscopia normal e RM de coluna normal. A paciente foi classificada como síndrome clínica isolada (CIS). Foi iniciado acompanhamento regular com exame neurológico trimestral, coleta do perfil de citocinas e RM semestral. ALAPL permaneceu com exame neurológico inalterado, EDSS e RM cerebral (Figura 5B) sem evolução da imagem.

No entanto, a avaliação de citocinas no sangue realizada no período entre essas imagens (Figura 5F), detectou o índice inflamatório mais elevado na

inteleucina-8 (IL8), na proteína inflamatória de macrófagos-1 β (MIP-1b), no fator de crescimento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), na eotaxina e na proteína quimioatrativa de monócitos tipo 1 (MCP-1). A dosagem subsequente de citocinas mostrou um índice ainda maior (Figura 5G e H) em comparação com a dosagem inicial (Figura 5E). Em maio de 2016, a RM detectou áreas hiperintensas sem aumento do contraste, confirmando lesões do SNC disseminadas no tempo e no espaço, apesar do exame neurológico normal e EDSS inalterado (Figura 5C).

Um mês depois, o perfil de citocinas mostrou um menor índice para todas as citocinas. O diagnóstico inicial foi modificado para EMP e foi iniciado terapia com interferon beta 1a (IFN- β 1a) subcutâneo em julho de 2016. Logo após a terapia com IFN- β 1a, o perfil de citocinas mostrou um aumento específico no índice de IP-10. Em março de 2017, a avaliação clínica neurológica e o EDSS se mostraram inalterados, com bom desempenho escolar e recente relato de menarca. No entanto, a ressonância magnética em abril de 2017 mostrou novas lesões do SNC com aumento do contraste no centro semi-oval direito, caracterizando o evento subsequente de desmielinização (Figura 5D). Em maio de 2017, o ALAPL foi hospitalizada e foi indicado o tratamento com metilprednisolona.

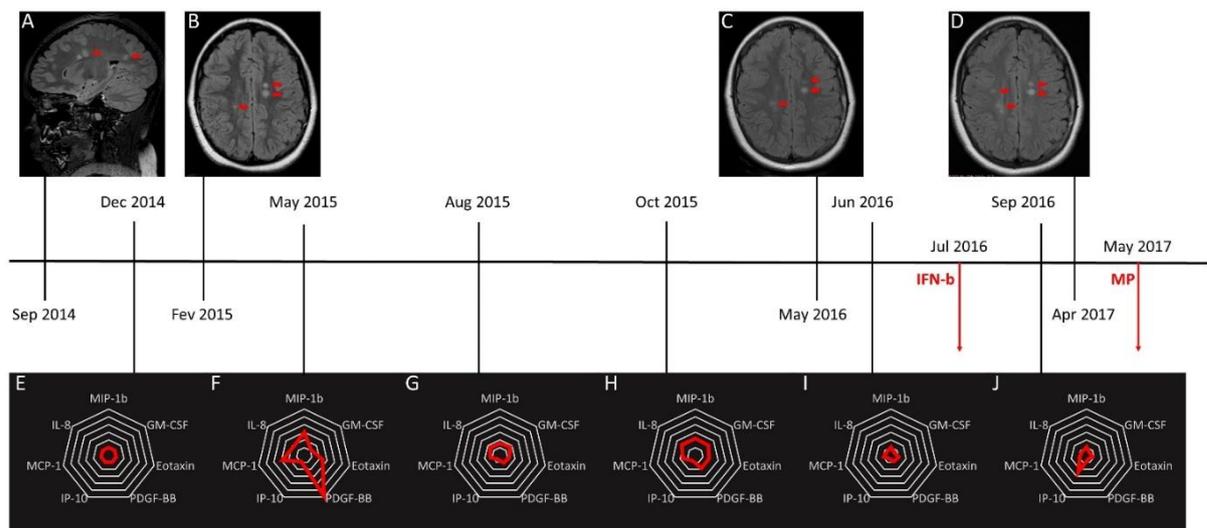


Figura 5 : acompanhamento do caso com RM e perfil inflamatório de citocinas: secções sagital sagital (A) e axial (B-D) mostrando lesões do SNC de FLAIR (setas vermelhas); Perfil de citocina (linha vermelha) em gráficos de aranha heptamerizados com índice de eixo concêntrico 6 normalizado para a primeira dosagem sérica (E) em comparação com medidas subsequentes (F-J). A intervenção terapêutica é mostrada nas setas vermelhas transversais da linha de tempo. O EDSS (escore = 1) e a avaliação clínica neurológica foram realizados nos mesmos momentos de perfil de citocinas e não alteraram durante esta avaliação da linha do tempo

VII.d Análise de Citocinas

Com o objetivo de estudar o padrão inflamatório dos pacientes portadores de DDA, amostras de soro foram utilizadas para a análise de um painel de 27 citocinas de 64 amostras entre os diferentes grupos de pacientes. Com o objetivo de criar uma classificação de citocinas em grupos funcionais, decidimos agrupar os analitos do kit utilizado em cinco diferentes grupos para facilitar a descrição e posterior discussão dos resultados (tabela 3).

Tabela 3: Painel de citocinas estudadas divididas por grupos

Citocinas				
Th1	Th2	Th17	Quimiocinas	Proliferativas
IFN- γ	IL-4	IL-6	MIP-1 α	G-CSF
TNF- α	IL-13	IL-1 α	MIP-1 β	GM-CSF
IL-2	IL-10	IL-1 β	RANTES	IL-7
IL-12p70	IL-5	IL-17a	IP-10	IL-9
		IL-15	MCP-1	Basic-FGF
			IL-8	VEGF
			Eotaxin	PDGF-BB

IP – Proteína Induzida por Gama Interferon; IL – Interleucina, MCP – Proteína Quimiotática de Monócito; GCSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócito; PDGF BB – Fator de Crescimento de Derivado de Plaqueta; VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial; GMCSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago; MIP1b – Proteína Inflamatória de Macrófago; TNF α - Fator de Necrose Tumoral; RANTES – Célula T Normal Expressa e Secretada Regulada na Ativação, FGF – Fator de Crescimento Básico de Fibroblasto

VII. e- Variações significativas no perfil de citocinas entre EMP e ADEM

Após as dosagens por Luminex, pode-se perceber que pacientes portadores de ADEM apresentam, em geral, um padrão menos inflamado que pacientes com EMP. A figura 6 é uma representação gráfica do nível de expressão das citocinas entre ADEM e EMP no formato *Heatmap*. A cor verde significa baixa expressão de citocinas, vermelha expressão elevada e preta expressão igual nas duas doenças, todas representadas por *z score*, com variância de -2 a + 2. No painel de citocinas avaliado, houve uma diferença estatística significativa em 20 citocinas das 27 estudadas, quando comparados os dois grupos mostrados sinalizados na figura 6.

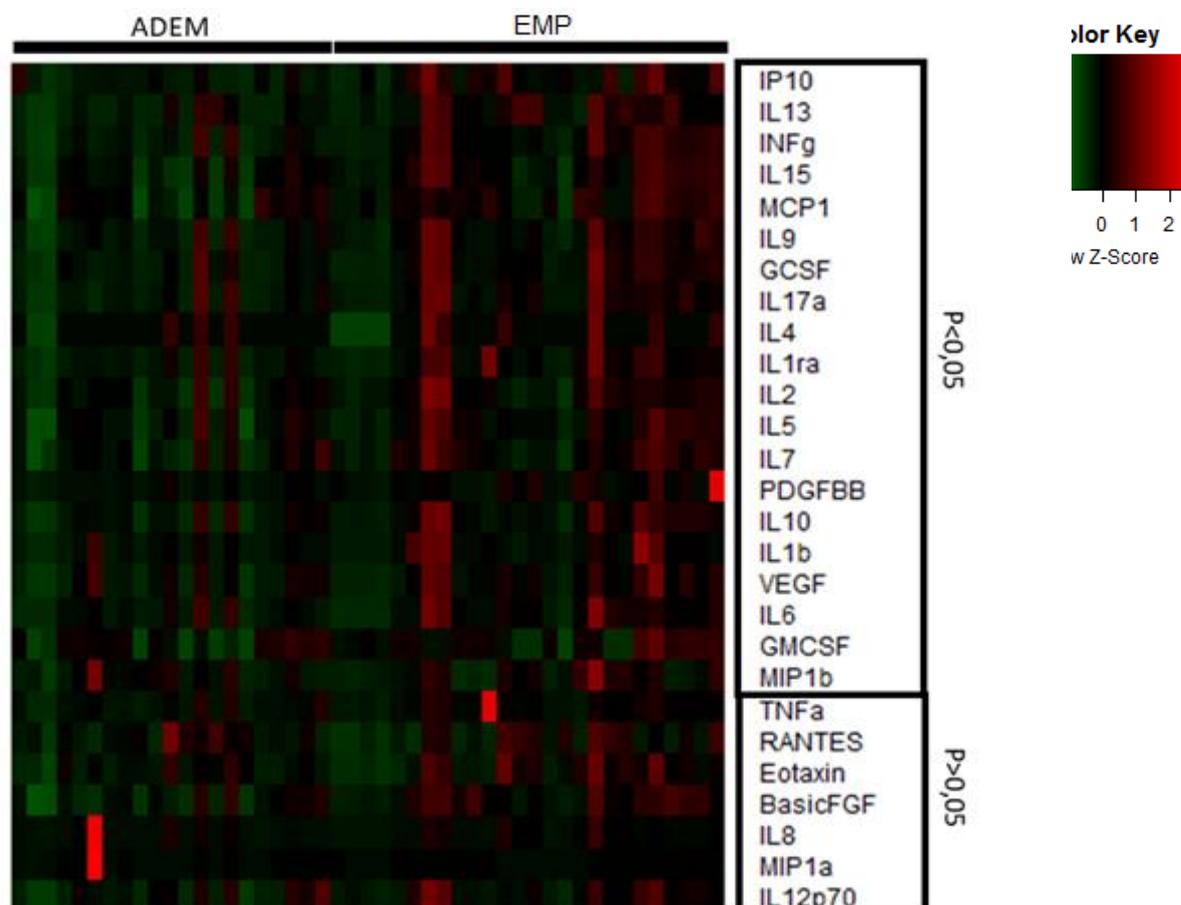


Figura 6: Heatmap com diferenças entre o perfil de expressão de citocinas entre os pacientes diagnosticados com ADEM e EMP. Legenda: IP – Proteína Induzida por Gama Interferon, IL – Interleucina; MCP – Proteína Quimiotática de Monócito; GCSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócito; PDGF BB – Fator de Crescimento de Derivado de Plaqueta; VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial; GMCSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócito-Macrófago; MIP1b – Proteína Inflamatória de Macrófago; TNF α – Fator de Necrose Tumoral; RANTES – Célula T Normal Expressa e Secretada Regulada na Ativação; FGF – Fator de Crescimento Básico de Fibroblasto; Em vermelho expressão aumentada de citocinas, em verde expressão diminuída de citocinas, em preto expressão média.

VII.f- Variações significativas no perfil de citocinas entre NMOSD e ADEM

Quando comparados os padrões de expressão de citocinas entre os pacientes ADEM e NMOSD, percebeu-se que houve uma diferença estatística significativa apenas em 3 citocinas: IL-7 (figura 7), IL-10 (figura 8) e GM-CSF

(figura 9), assim como no caso da EMP, os pacientes ADEM tendem a apresentar um padrão de expressão de citocinas menor que os pacientes com diagnóstico de NMOSD.

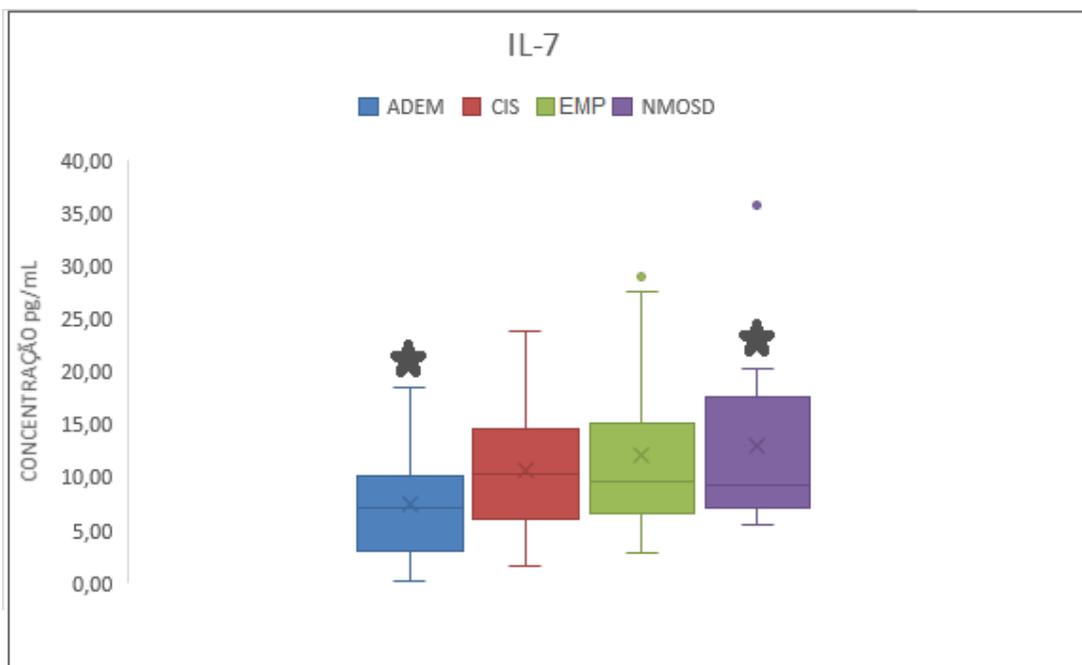


Figura 7: Boxplot entre as DDA para a citocina IL-7 (interleucina). Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativas entre ADEM e NMOSD pelo pós-teste de Tukey $p=0,049$

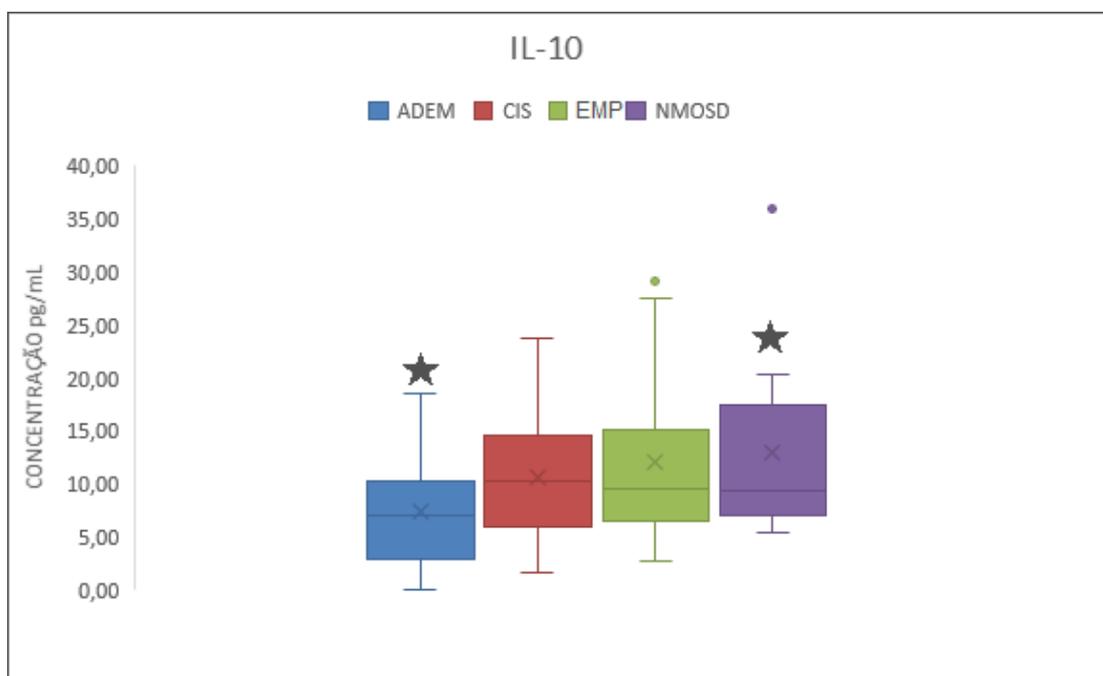


Figura 8: Boxplot entre as DDA para a citocina IL-10 (interleucina). Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativas entre ADEM e NMOSD pelo pós-teste de Tukey $p=0,044$

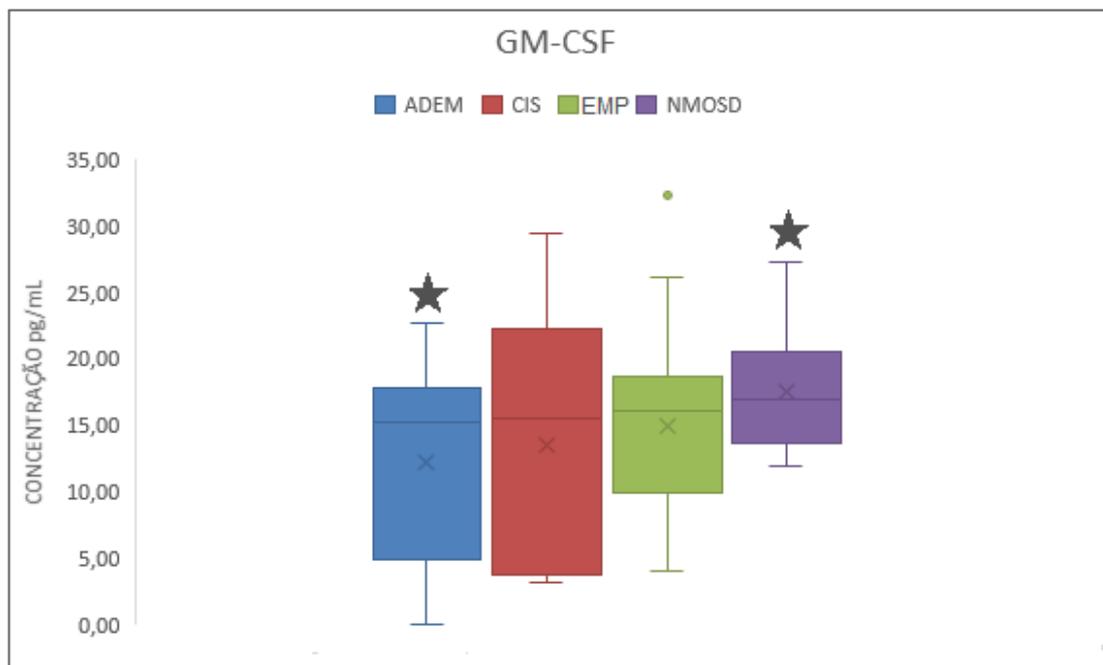


Figura 9: Boxplot entre as DDA para a citocina GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócito-macrófago). Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativas entre ADEM e NMOSD pelo pós-teste de Tukey $p=0,05$

VII.g- Variações significativas no perfil de citocinas entre CIS e ADEM

Quando comparados os pacientes ADEM com CIS, a quimiocina que se mostrou com diferença estatística significativa foi a MIP-1b (figura 10).

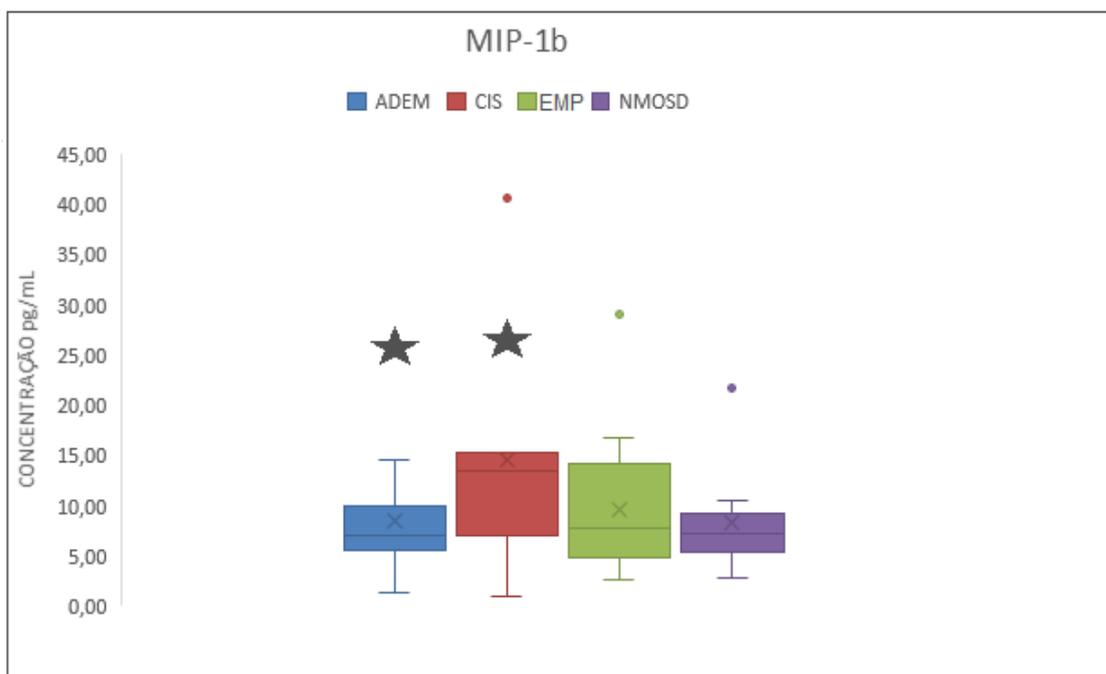


Figura 10: Boxplot entre as DDA para a citocina MIP-1b (proteína inflamatória de macrófago) Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativa entre ADEM e CIS pelo pós-teste de Tukey $p=0,04$

VII.h- Variações significativas no perfil de citocinas entre EMP e CIS

A comparação que resultou em diferenças estatísticas na análise de citocinas séricas entre pacientes CIS e EM, onde foi apenas a quimiocina IP-10 (figura 11) que mostrou-se com uma diferença estatística significativa de p valor 0,017, onde foram evidenciados valores mais expressivos para EM.

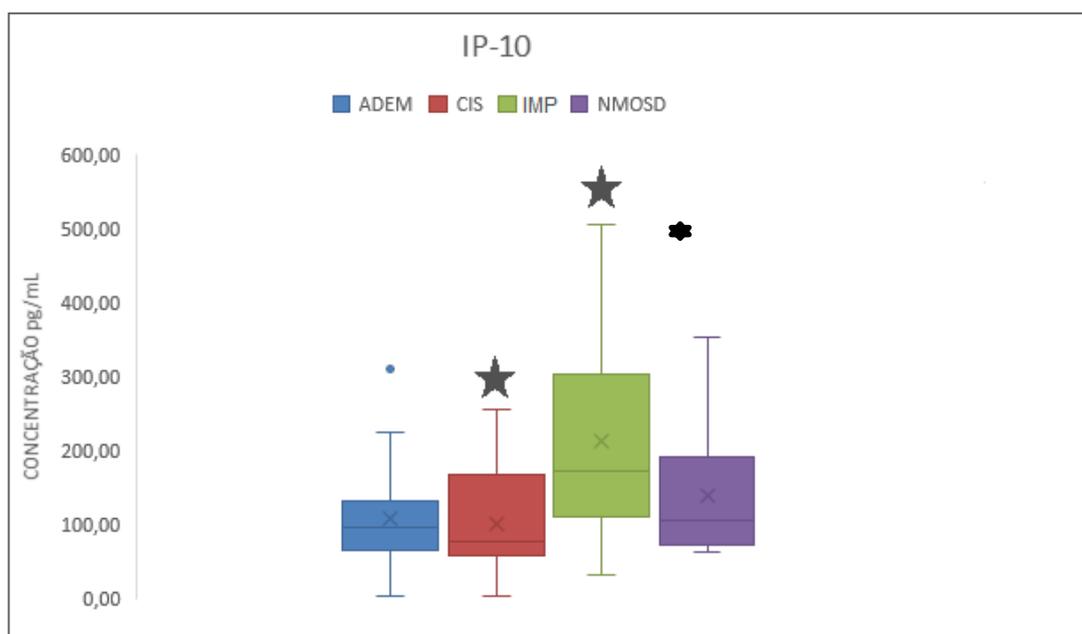


Figura 11: Boxplot entre as DDA para a quimiocina IP-10 (proteína induzida por gama interferon-10) Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativas entre EM e CIS pelo pós-teste de Tukey $p=0,017$

VII.i- Variações significativas no perfil de citocinas entre NMOSD e EMP

Na comparação com valores significativos entre pacientes com EMP e NMOSD, foi apenas a eotaxina que apresentou uma diferença estatisticamente significativa com p valor 0,047. Neste caso, de acordo com a figura 12, verifica-se uma alta expressão de eotaxina nos pacientes com EMP em comparação com os pacientes que apresentam NMOSD.

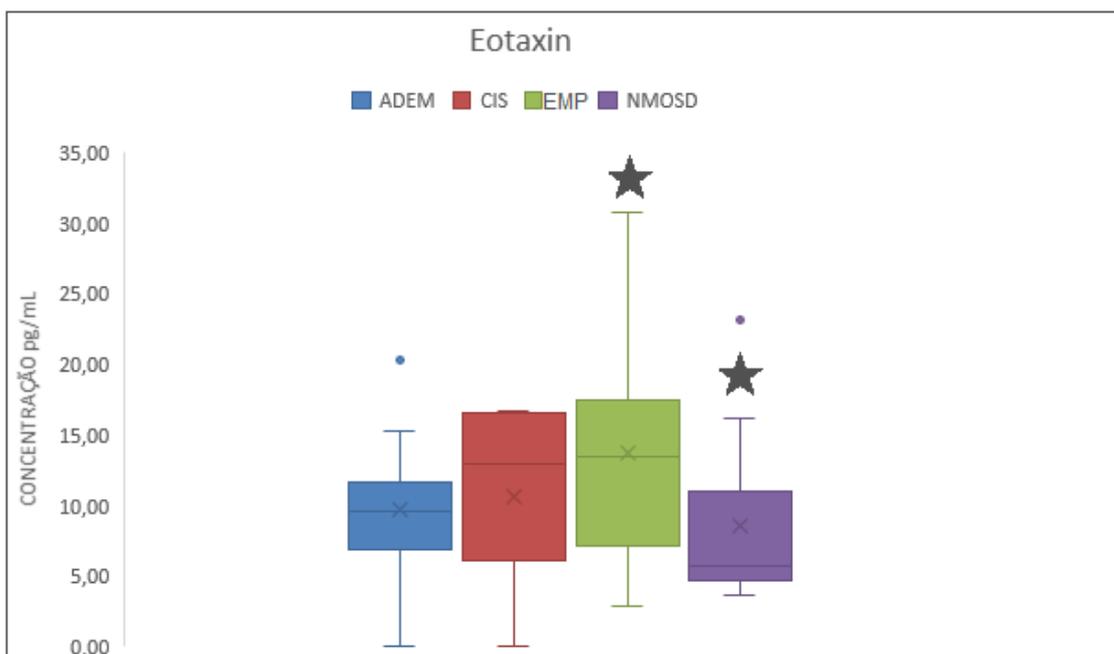


Figura 12: Boxplot entre as DDA para a quimiocina eotaxina. Amostras de citocinas testadas 64, sendo 21 ADEM, 7 CIS, 26 EMP, 10 NMOSD. Teste estatístico ANOVA, diferença significativa entre EMP e NMOSD pelo pós-teste de Tukey $p=0,047$

VII.j- Análise de Mapa Diagnóstico em Árvore de Decisão

A última análise proposta foi a criação de uma árvore de decisão para classificação dos pacientes portadores de DDA, que pudesse auxiliar no diagnóstico baseados nas citocinas estudadas em cada grupo.

O procedimento de Árvore de Decisão cria um modelo de classificação hierárquico. Ele classifica casos em grupos ou prevê valores de uma variável dependente (de destino) com base em valores de variáveis independentes (preditoras). O procedimento fornece ferramentas de validação para análise de classificação exploratória e confirmatória (91).

A árvore de decisão é uma ferramenta estatística para classificação, definição e tomada de decisões frente as múltiplas variáveis, de forma hierárquica. Muito utilizada em medicina, é um modelo multivariável que neste

trabalho foi empregado para avaliar a capacidade de diagnóstico diferencial entre as DDA frente aos parâmetros imunológicos/inflamatórios (92).

Metodologicamente, foram realizadas quatro árvores de decisão, sendo cada uma aplicada a uma diferente DDA:

-Árvore de decisão para ADEM:

Foi realizada a análise das 27 citocinas nas amostras séricas de todos os pacientes com DDA e elas foram submetidas a um teste de decisão em árvore, dividindo as amostras em apenas 2 grupos, ADEM e não-ADEM. A citocina que inicialmente consegue classificar os casos de ADEM comparando com não-ADEM é a Basic-FGF, onde os pacientes apresentam níveis séricos menores ou iguais a 13,660 pg/mL. A figura 13 demonstra que 88,9% das amostras dos pacientes ADEM se enquadram nesse valor. Apenas mais uma citocina, a MIP-1b é capaz de incluir 100% das amostras quando seu valor sérico é maior que 1,240 pg/mL, atingindo um p valor bastante significativo de 0,028. Portanto, sugere-se que para o diagnóstico de ADEM, as citocinas Basic-FGF e MIP-1b são suficientes para classificação dos pacientes ADEM no nosso estudo.

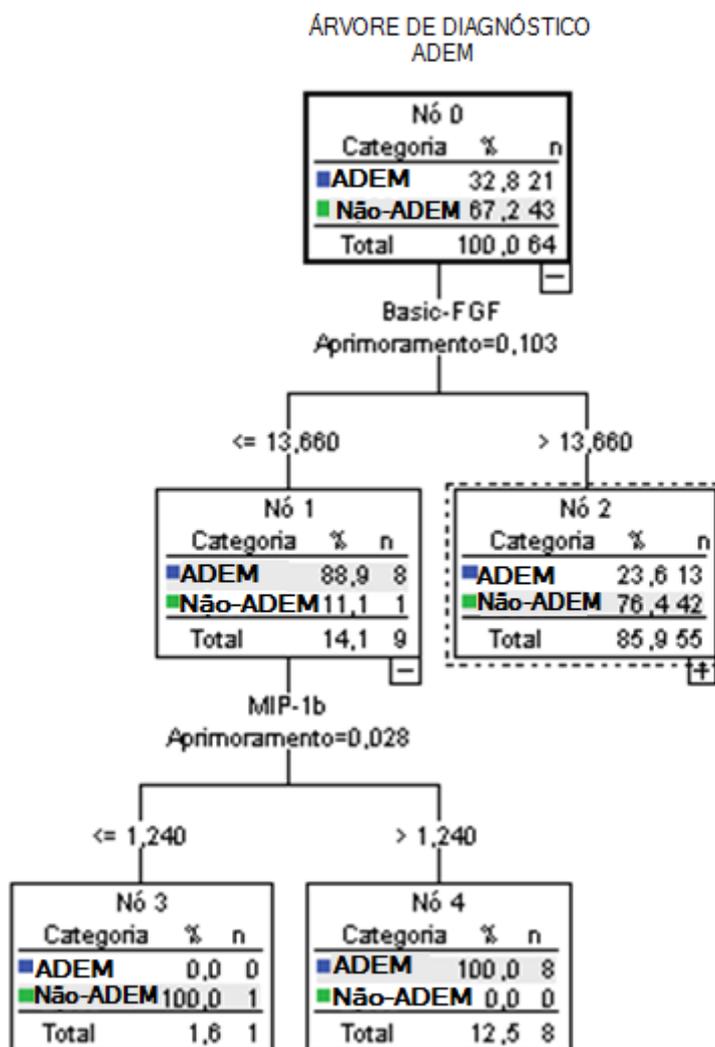


Figura 13: Árvore de decisão entre os diagnósticos ADEM, não-ADEM. Basic-FGF: fator de crescimento básico de fibroblasto; MIP-1b proteína inflamatória de macrófago

-Árvore de decisão para CIS:

No caso de CIS, a citocina que inicialmente consegue classificar os casos de CIS comparando com não-CIS é a IL-2, onde pacientes CIS apresentam níveis séricos maiores a 3,721 pg/mL. A figura 14 mostra que 100% dos pacientes de CIS apresentam uma associação entre IL-2 e VEGF quando o VEGF atinge um valor maior que 6,173 pg/mL. Sugere-se uma possível classificação para CIS em pacientes com essa associação. Nesse caso o p valor

encontrado é maior que 0,05, provavelmente pelo número de pacientes incluídos no estudo.

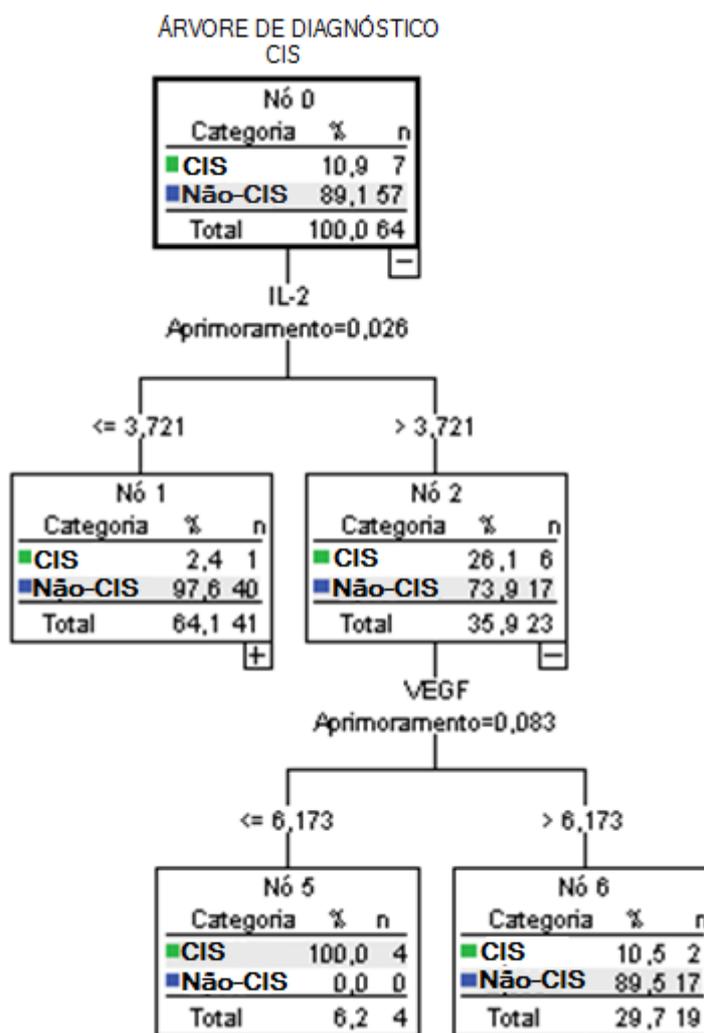


Figura 14: Árvore de decisão entre os diagnósticos CIS, não-CIS. IL- interleucina; VEGF- fator de crescimento vascular endotelial

-Árvore de decisão para EMP:

Para EMP, a árvore apresenta um maior número de citocinas a serem associadas para a definição de casos frente aos pacientes não - EMP. Conforme observado na figura 15, das 26 amostras iniciais com diagnóstico de EMP, 13 amostras apresentam-se na árvore com o IP-10 maior que 128,297 pg/mL, seguido de IL-13 maior que 1,445 pg/mL, IL-2 menor que 5,407 pg/mL, TNF- α

menor que 21,045 pg/mL. Nesse caso, ao final da árvore, os resultados do algoritmo alcançam um p valor de 0,026, demonstrando um valor estatístico significativo.

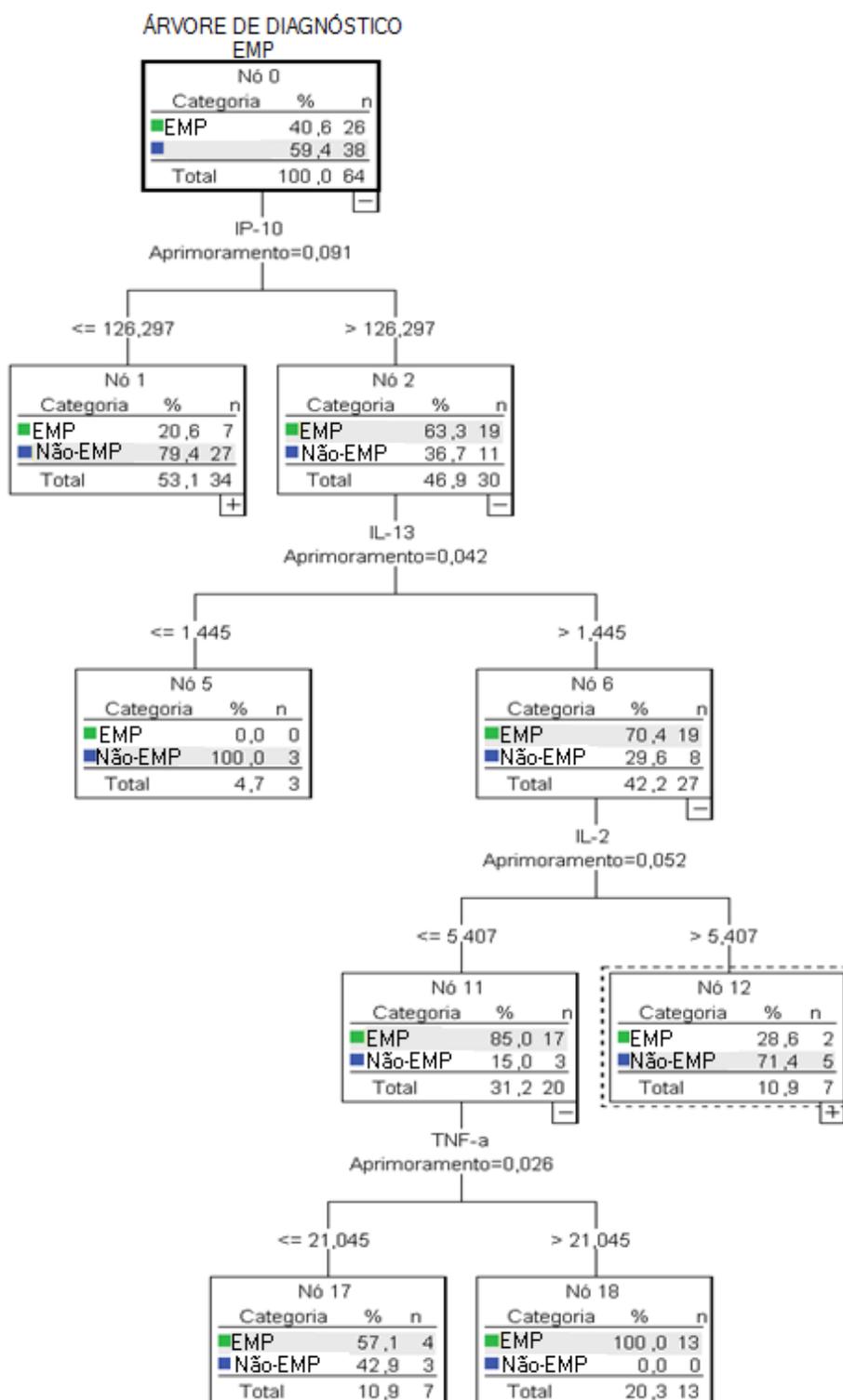


Figura 15: Árvore de decisão entre os diagnósticos EMP, não-EMP. IP proteína induzida por gama interferon; IL interleucina; TNF fator de necrose tumoral

-Árvore de decisão para NMOSD:

Finalmente, para o diagnóstico de NMOSD, a quimiocina eotaxina quando se apresenta menor que 6,52 pg/mL, em associação com IL-17 maior que 3,995 pg/ml e IP-10 menor que 129,13 pg/ml aponta para um possível diagnóstico mais preciso, com 6 das 10 amostras avaliadas, atingindo um p valor de 0,027, conforme visto na figura 16,

VIII. Discussão

No período entre 2012 a 2016, 30 pacientes foram encaminhados e avaliados evolutivamente com diagnóstico de DDA. Do total, 40% da amostra foi excluída, demonstrando que o diagnóstico inicial, apesar de possuir um consenso revisado, é de difícil suspeição e confirmação, além de se tratar de um grupo de doenças raras (incidência de 0,66 a 1,15/100.000) (3,29). Devido a esse fato, a análise proposta foi mais descritiva, já que para o cálculo de incidência não há um número expressivo de pacientes e/ou amostras, mesmo se tratando de um centro de referência para DDA.

A mediana de idade se mostra mais baixa em ADEM comparativamente com os outras doenças provavelmente pela maior exposição a patógenos e vacinação nessa faixa etária, conforme descrito por *Karussis et al.* (93), apesar de *Pohl et al.* acreditarem que não existe casualidade entre infecção, vacinação e ADEM(32). *Papais-Alvarenga et al.*, no estudo sobre doenças desmielinizantes nas Américas, apresenta quando estratificado por idade (0 a 19 anos) que sua amostra possui diagnósticos de EMP, NMOSD e CIS, corroborando nosso resultado. A média de idade do início dos sintomas para esses diagnósticos foi de 7,3 anos (35). *Casper et al.*, em estudo multicêntrico do US Network of Pediatric MS Centers, apresenta dado semelhante (94).

A escala EDSS para nossa amostra não se mostrou uma boa escala para acompanhamento do exame neurológico em pediatria, conforme também descrito por *van der Vuurst de Vries et al.*, onde a velocidade de aumento do EDSS é maior em adultos que em pediatria (95), provavelmente pela escala ser

mais relacionada a funções motoras e não haver avaliação fina dentro da escala quanto a cognição ou ao desenvolvimento neuropsicomotor (96).

A média de surtos entre as DDA variou entre 1,0 a 2,8 durante o período de quatro anos. Em relação aos surtos em EMP, a mediana se mostrou semelhante a literatura, demonstrando que pacientes com EMP apresentam mais surtos comparados a adultos (42).

Em relação a BOC, os pacientes com EMP apresentaram maior positividade conforme também descrito na literatura (44). Em contrapartida, somente um paciente com diagnóstico de NMOSD apresentou positividade na AQP4. Tal fato também é descrito na literatura, onde a positividade costuma ser menor na faixa etária pediátrica (34).

Durante a fase de surto os pacientes com diagnóstico de ADEM, EMP e NMOSD foram tratados com metilprednisolona e/ou VZIG, não necessariamente no mesmo surto. Em EMP o tratamento durante a fase de remissão foi interferon beta e, no caso de NMO, acetato de glatiramer, conforme o protocolo do Ministério da Saúde (8).

O relato de caso descrito relata a transformação do diagnóstico de CIS para EMP. Foi realizado acompanhamento transversal por seguimento ambulatorial e coletadas as citocinas séricas durante o período de setembro de 2014 a setembro de 2016, além da realização de exame de imagem seriado. A paciente apresentou-se durante todo acompanhamento neurológico assintomática, com um EDSS baixo (1,0). Porém evolutivamente houve piora do número de lesões tanto no tempo quanto no espaço indicando a progressão para o diagnóstico de EMP. Segundo a literatura, a taxa de conversão de CIS para

EM é de 21% com uma mediana de 3,1 anos entre os diagnósticos (97). Os fatores de risco aumentados de MS são a primeira desmielinização na adolescência, sexo feminino e manifestações polifocais, enquanto crianças menores com ADEM apresentam menor risco (98). ALAPL apresentou sua primeira manifestação de desmielinização antes da adolescência, com manifestações clínicas focais e regressão espontânea. No entanto, devido ao seguimento radiológico regular, foi possível seguir lesões subsequentes e estabelecer tratamento imunomodulador precoce. O relato de caso não demonstra coincidência temporal entre as avaliações clínicas, radiológicas e inflamatórias. Das 27 citocinas avaliadas apenas IL8, MIP-1b, PDGF-BB, Eotaxin, MCP-1 e IP-10 mostraram variações significativas durante a análise. O pico inflamatório mais alto foi observado um ano antes da correlação radiológica, com um segundo pico menor seis meses antes da RM evolutiva que fechava o diagnóstico. A citocina PDGF-BB é descrita como um potencial biomarcador proinflamatório, pois induz crescimento de células progenitoras oligodendrogliais e contribui para a angiogênese. Entretanto, *Su et al.* não conseguiram correlacionar seus níveis aumentados e lesões do SNC em adultos com EM (99). MIP-1b está associado a uma resposta imune possível ao interferon beta (100). Nosso resultado mostrou aumento durante o primeiro pico de citocinas e antes do tratamento imunomodulador. Apenas os níveis diminuídos de Eotaxin foram relatados anteriormente pelo estudo de *Tejera-Alhambra*, onde uma associação foi encontrada com MS recorrente recorrente em adultos (101). Além disso, o IP-10 encontrou-se substancialmente aumentada após o início da terapia com interferon beta, conforme relatado por *Buttman et al.* em 2004 (102).

Uma vez que as amostras de EMP expressavam um nível maior de diversas citocinas em relação a ADEM, resolvemos expressar os resultados num gráfico Heatmap que permite demonstrar a diferença de nível de expressão de todas as amostras analisadas entre esses dois grupos de pacientes. Ficou evidente que a grande maioria das amostras de pacientes EMP tendem a apresentar aumento significativo na expressão de 20 diferentes citocinas das 27 estudadas.

Vale lembrar que, como as coletas foram ambulatoriais, os pacientes de ADEM não apresentavam novos sintomas neurológicos no momento das coletas, ou seja, não estavam no período da desmielinização aguda, justificando possivelmente o padrão menos inflamado comparado a EMP já descrita como uma doença inflamatória autoimune crônica, portanto, cronicamente inflamado. *Calas et al.* estudou o padrão de citocinas entre pacientes EMP na fase de remissão e recorrência comparado a controles saudáveis. Houve uma maior expressão de citocinas durante a fase de recorrência (17 citocinas/25 examinadas) em comparação a fase de remissão (9/25) (79), porém, assim como nosso estudo, não fica claro um padrão de citocinas associado a um grupo funcional, levando a crer que, diferente do que é descrito classicamente, a EMP é uma doença mediada por células e mecanismos moleculares, tanto da imunidade inata, quanto da adaptativa. Mais ainda, esse padrão multicitocinas leva a crer que diferentes subtipos celulares do sistema imune estão implicadas na desmielinização.

A análise comparativa das citocinas entre as diferentes DD demonstrada pelos boxplots aponta para a ausência de um subtipo específico celular para cada doença, porém sempre num caráter mais restritivo com um número

reduzido de citocinas que são significativamente diferentes entre as DD. Quando ADEM foi comparado a NMOSD, as três citocinas estatisticamente significativas (IL-7, IL-10, GM-CSF) demonstram um padrão Th2 (IL-10) associado a fatores de crescimento (IL-7 e GM-CSF). Esses fatores são descritos na literatura como responsáveis pelo aumento/manutenção da sobrevivência de células T (IL-7) e granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (13), podendo indicar um aumento do número de células com perfil regulatório na NMOSD. Em seu artigo, *Michael* demonstra um padrão de citocinas/quimiocinas sugestivo para o diagnóstico de NMOSD: MIP1b, eotaxina, G-CSF, MPO, IL17a e IL9 (103).

Na comparação das citocinas entre CIS e ADEM, foi demonstrada uma diferença significativa para a quimiocina MIP-1b, que é descrita como importante para a migração de monócitos e a NK, estando por sua vez, mais relacionada a imunidade inata e adaptativa. *Tejera-Alhambra* refere que as células alvo para MIP-1b na EM são linfócitos T CD8+ e sua presença foi detectada em placas ativas de desmielinização. A expressão de MIP-1b é realizada por macrófagos e as células de micróglia (101).

IP-10 é fortemente associada ao perfil Th1, sendo descrito que o interferon gama produzido por essas células é responsável por induzir a expressão de IP-10 pelas células da imunidade inata, principalmente da linhagem mono-macrofágica (104). IP-10 por sua vez estimula migração de monócitos, célula NK e célula T (104). Na comparação entre EMP e CIS, há uma diferença significativa para IP-10. Porém, além do mecanismo de ação de IP-10 descrito acima, a literatura aponta para um aumento sérico de IP-10 em soro de pacientes com EM em tratamento com interferon beta, sugerindo talvez um efeito anti-inflamatório associado (105,106).

A eotaxina é uma quimicina associada a migração de eosinófilos. Nas nossas amostras houve uma diferença significativa entre os níveis de eotaxina entre EMN e NMOSD. *Tejera-Alhambra et al.*, no seu artigo, demonstrou que os níveis de eotaxina estão mais baixos na EM remitente-recorrente que na forma progressiva em adultos (101). O artigo de *Michael et al.* avaliou o perfil de citocinas entre EM e NMOSD e verificou que há um aumento na expressão de eotaxina em NMOSD em comparação a EM (103).

O modelo de árvore de decisões é um modelo multivariável capaz de calcular a chance de diagnóstico entre as DDA com base em combinações de biomarcadores fornecendo estimativas razoáveis. A partir da combinação dos biomarcadores há uma chance maior daquela associação ser mais encontrada em um subgrupo específico de DDA. As árvores podem ser uma ferramenta prática com potencial papel no diagnóstico das DDA como foi mostrado por *Férrnandes-Paredes* em seu artigo sobre estratificação de risco em EM e suas diversas formas no início da doença (92). Como já descrito anteriormente, e inclusive nossos dados demonstram que a positividade para AQP4 em crianças é baixa (tabela 2). Uma possibilidade de avaliação futura seria dosar as citocinas da árvore de decisão em NMOSD para pacientes com suspeita e comparar com a positividade da AQP4, já que dentro da árvore de decisões a positividade do diagnóstico frente a associação de citocinas atingiu valores bastante significativos (seis amostras num total de dez com p valor de 0,027).

Os resultados apresentados incitam uma série de dúvidas em relação ao modo clássico que é apresentado o modelo de DDA tanto em pediatria quanto nos adultos. Didaticamente as doenças autoimunes do tipo EM são classificadas como doenças relacionadas ao linfócito Th1. A partir da análise de um painel

ampliado de citocinas, que inclui representantes de diferentes grupos funcionais (tabela 3), é possível confrontar os dados da literatura tanto de modelos experimentais como em estudos clínicos, e ampliar o espectro de ativação do sistema imune durante a neuro-inflamação e considerar essas doenças não exclusivas de resposta celulares do tipo Th1.

Nossos resultados apontam para uma imunofisiopatologia semelhante entre a população adulta e pediátrica. Acreditava-se que por se tratar de uma análise entre pacientes pediátricos haveria uma expressão maior de citocinas Th1 já que, no caso das DDA crônicas como EMP e NMOSD, o tempo de doença é pequeno e a inflamação seria maior. Porém, ao analisar as citocinas vimos que tanto as citocinas como quimiocinas, fatores de crescimento e Tregs estão desde o início da doença presentes, colocando em dúvida a teoria de que somente quando a doença se torna progressiva há uma maior participação de outras linhagens celulares como as células B. Nas DDA, o mecanismo de injúria da mielina é multicelular, com a participação de células da imunidade inata e adaptativa, com a participação dos diversos tipos de células T (Th1, Th2, Th17, Treg e possivelmente outros tipos), além da participação das células B produzindo anticorpos e perpetuando a injúria mesmo com um decréscimo na inflamação. O conceito de linfócito T polifuncional, ou seja, linfócito que produz múltiplas citocinas simultaneamente, vem sendo proposto e demonstra a plasticidade do sistema imune adaptativo ao longo do curso de uma patologia mediada por linfócitos (107). Nossos resultados, principalmente quando comparamos a ADEM com a EMP, sugerem que essas células estejam participando ativamente do processo da fisiopatologia da EMP e permite

hipotetizar que o papel das citocinas como biomarcadores não é estático ou definitivo, tanto celular como molecularmente.

Através de mecanismos de feedback positivo e negativo uma mesma citocina pode apresentar mecanismos inflamatórios e anti-inflamatórios, ou ainda, estar presente em altas concentrações num momento e abolir sua expressão no momento seguinte, prejudicando sobremaneira estudos de análise transversal em pacientes (80). É importante, portanto, buscar o fortalecimento dos resultados já alcançados nesse trabalho com avaliações de um maior número de pacientes para sermos capazes de confirmar e assegurar o papel dessas citocinas como biomarcadores séricos com potencial diagnóstico. Além disso, permitir ampliar o conceito imunofisiopatológico da desmielinização para melhor entendimento da clínica, melhor diagnóstico, melhor terapêutica e melhor seguimento dos pacientes com DDA.

Limitações do estudo

Por se tratar de um conjunto de doenças com incidência baixa em pediatria, o número de pacientes avaliados foi pequeno, comprometendo grande parte das análises realizadas. O número de perdas, apesar de pequeno, contribuiu para a dificuldade da análise.

O modelo do estudo apresentou algumas falhas, principalmente para a periodicidade da coleta do sangue dos pacientes, também prejudicando melhores análises comparativas.

As coletas foram realizadas em qualquer fase da doença e pelo número pequeno de amostras não foi possível realizar estratificação quanto a fase aguda/surto e remissão.

Como foi uma análise entre tipos diferentes de DDA e suas diferentes apresentações de inflamação, não houve grupo controle, também dificultando a comparação entre artigos científicos que possuem controles saudáveis.

Há necessidade de se estudar, além das citocinas, os painéis linfocitários e de autoanticorpos para uma mais ampla análise imunológica do paciente. Avaliações genéticas também seriam benéficas, uma vez que a população brasileira é muito miscigenada, e poderíamos excluir a possibilidade de viés de polimorfismos HLA ou não-HLA.

Não há padronização específica para valores de referência sérica em citocinas/quimiocinas, dessa forma, as análises são realizadas através de comparações diretas entre os pacientes. Tais análises não significam níveis séricos normais ou alterados, apenas variações na expressão.

A avaliação de citocinas/quimiocinas na prática clínica é muito incipiente por todas as razões descritas acima, sendo mais utilizada em pesquisa. Uma alternativa seria justamente estudar quais citocinas, diante de um painel abrangente, apresentar-se-iam estatisticamente relevantes, com o objetivo futuro de aumentar o número amostral com os biomarcadores candidatos.

IX. Conclusões:

- Não foram encontradas sincronia temporal entre a alteração do perfil de citocinas e os exames de RM, ou a avaliação neurológica, ou o tratamento no relato de caso e posteriormente nas análises da coorte;

- A associação entre o perfil inflamatório mais específico e exame de imagem poderá antecipar eventos de desmielinização e evolução clínica em EMP;

- A EMP apresentou um padrão inflamatório polifuncional e não apenas Th1, com 20 citocinas significativamente mais expressas, quando comparado com pacientes ADEM;

- As citocinas IL-2, IL-7, IL-13, Basic-FGF, MIP-1b, VEGF, Eotaxina, IP-10 e TNF- α foram capazes de classificar todos os pacientes DDA em seus grupos específicos, reduzindo para nove as citocinas com potencial função de biomarcador sérico para o diagnóstico diferencial no nosso estudo.

X- Referências Bibliográficas

1. Poser CM. The multiple sclerosis trait and the development of multiple sclerosis: Genetic vulnerability and environmental effect. *Clin Neurol Neurosurg.* 2006;108(3):227–33.
2. Oksenberg JR, Baranzini SE. Multiple sclerosis genetics- the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2010;6(8):429–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2010.91>
3. Ketelslegers IA, Catsman-Berrevoets CE, Neuteboom RF, Boon M, Van Dijk KGJ, Eikelenboom MJ, et al. Incidence of acquired demyelinating syndromes of the CNS in Dutch children: A nationwide study. *J Neurol.* 2012;259(9):1929–35.
4. Langer-Gould A, Zhang JL, Chung J, Yeung Y, Waubant E, Yao J. Incidence of acquired CNS demyelinating syndromes in a multiethnic cohort of children. *Neurology.* 2011;77(12):1143–8.
5. Menkes JH, Sarnat HB, Maria BL. *Child neurology* [Internet]. 7th ed. Lippincot Williams and Wilkins; 2006 [cited 2017 Dec 23]. 1200 p. Available from: https://books.google.com.br/books/about/Child_Neurology.html?id=gnjMX_jtvYoC&redir_esc=y
6. Krupp LB, Banwell B, Tenembaum S. Consensus definitions proposed for pediatric multiple sclerosis and related disorders. *Neurology.* 2007;68(16 SUPPL. 2):7–12.
7. Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC, et al. International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating

disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult Scler J* [Internet]. 2013;19(10):1261–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572237>

8. Magalhães Jr MH. Esclerose Multipla - PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS [Internet]. Saúde S de A à, editor. Ministério da Saúde- Brasil; 2013. 24 p. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/PDF/2014/fevereiro/07/pcdt-esclerose-multipla-2013.pdf>

9. Fragoso YD, Brooks JBB, dos Leal TM. Perfil descritivo de esclerose múltipla com início até os 16 anos nos pacientes de um centro de referência do estado de São Paulo. *Rev Paul Pediatr*. 2012;30(4):617–20.

10. Zhang X, Markovic-Plese S. Interferon beta inhibits the Th17 cell-mediated autoimmune response in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2010;112(7):641–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2010.04.020>

11. Nylander A, Hafler D a. Multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2012;122(4):1180–8.

12. Laplaud D-A, Berthelot L, Miqueu P, Bourcier K, Moynard J, Oudinet Y, et al. Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *J Neuroimmunol*. 2006;177(1–2):151–60.

13. Abbas, A; Lichtman A; Pillai S. *Imunologia Celular e molecular*. 8a edição. Saunders Elsevier; 2015.

14. Mirandola SR, Hallal DEM, Farias AS, Oliveira EC, Brandão CO, Ruocco HH, et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2009;9:824–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2009.03.004>
15. Trenova AG, Manova MG, Kostadinova II, Murdjeva MA, Hristova DR, Vasileva T V, et al. Clinical and laboratory study of pro-inflammatory and antiinflammatory cytokines in women with multiple sclerosis. *Folia Med (Plovdiv)* [Internet]. [cited 2017 Dec 23];53(2):29–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21797104>
16. Chihara N, Aranami T, Sato W, Miyazaki Y, Miyake S, Okamoto T, et al. Interleukin 6 signaling promotes anti-aquaporin 4 autoantibody production from plasmablasts in neuromyelitis optica. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2011;108(9):3701–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017385108>
17. Chabas, D; Waubant E. *Demeylinating Disorders of the cantral nervous system in childhood*. 1a ed. Chabas, E; Waubant D, editor. Cambridge: Cambridge Uniiversity Press; 2011.
18. Hanefeld F. Pediatric multiple sclerosis: A short history of a long story. *Neurology*. 2007;68(16 SUPPL. 2):3–6.
19. Lucas J. An account of uncommon symptoms succeeding measles: with some additional remarks on the infection of measles and smallpox. *L Med J*. 1790;11:325–31.

20. D., McAlpine; Glasg MD; Lond M. ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS: ITS SEQUELAE; AND ITS RELATIONSHIP TO DISSEMINATED SCLEROSIS. *Lancet*. 1931;217:846–52.

21. Niels B, 1. Low MD, and Sidney Carter M. Multiple Sclerosis in Children. *Pediatrics*. 1956;34(3):24–30.

22. John C. Gall, Jr., M.D., Alvin B. Hayles, M.D., Robert G. Siekert MD, and Haddow M. Keith MD. MULTIPLE SCLEROSIS IN CHILDREN A Clinical Study of 40 Cases with Onset in Childhood. *Pediatrics*. 1958;21:703–9.

23. Duquette P, Murray TJ, Pleines J, Ebers GC, Sadovnick D, Weldon P, et al. Multiple sclerosis in childhood: Clinical profile in 125 patients. *J Pediatr*. 1987;111(3):359–63.

24. Mcdonald W, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hp H, Fd L, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50:121–7.

25. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292–302.

26. Ghezzi A, Deplano V, Faroni J, Grasso M, Liguori M, Marrosu G, et al. Multiple sclerosis in childhood: clinical features of 149 cases. *Mult Scler J* [Internet]. 1997;3(1):43–6. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/135245859700300105>

27. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor B V., et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with

widespread inequity. *Neurology* [Internet]. 2014;83(11):1022–4. Available from: <http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.0000000000000768>

28. Yamaguchi Y, Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Sakai Y, Sanefuji M, et al. A nationwide survey of pediatric acquired demyelinating syndromes in Japan. *Neurology*. 2016;87(19):2006–15.

29. Gudbjornsson BT, Haraldsson Sgeir, Einarsdottir H, Thorarensen Jlafur. Nationwide Incidence of Acquired Central Nervous System Demyelination in Icelandic Children. *Pediatr Neurol* [Internet]. 2015;53(6):503–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2015.08.020>

30. Yeh EA, Graves JS, Benson LA, Wassmer E, Waldman A. Pediatric optic neuritis. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S53–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572862>

31. Absoud M, Greenberg BM, Lim M, Lotze T, Thomas T, Deiva K. Pediatric transverse myelitis. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S46–52. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002820>

32. Pohl D, Alper G, Van Haren K, Kornberg AJ, Lucchinetti CF, Tenenbaum S, et al. Acute disseminated encephalomyelitis: Updates on an inflammatory CNS syndrome. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Suppl 2):S38-45. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002825>

33. Waldman A, Ness J, Pohl D, Simone IL, Anlar B, Amato MP, et al. Pediatric multiple sclerosis. Clinical features and outcome. *Neurology* [Internet].

2016;87(9 Supplement 2):S74–81. Available from:
<http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000003028>

34. Tenenbaum S, Chitnis T, Nakashima I, Collongues N, McKeon A, Levy M, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorders in children and adolescents. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S59–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572863>

35. Papais-Alvarenga RM, Vasconcelos CCF, Carra A, De Castillo IS, Florentin S, De Bedoya FHD, et al. Central nervous system idiopathic inflammatory demyelinating disorders in South Americans: A descriptive, multicenter, cross-sectional study. *PLoS One*. 2015;10(7):1–20.

36. Suchdev K, Razmjou S, Venkatachalam P, Khan OA, Mohamed W, Ibrahim MS. Late onset neuromyelitis optica mimicking an acute stroke in an elderly patient. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2017 Aug [cited 2017 Jul 19];309:1–3. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572817301467>

37. Verhey LH, Branson HM, Shroff MM, Callen DJA, Sled JG, Narayanan S, et al. MRI parameters for prediction of multiple sclerosis diagnosis in children with acute CNS demyelination: a prospective national cohort study. *Lancet Neurol* [Internet]. 10(12):1065–73. Available from:
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70250-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70250-2)

38. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2018;131(January):808–17.

39. Pohl D, Alper G, Van Haren K, et al. Acute Disseminated Encephalomyelitis. *Neurology* [Internet]. 2016;87(2):S38–45. Available from: <http://emedicine.medscape.com/article/1147044-overview>

40. Esposito S, Di Pietro GM, Madini B, Mastrolia MV, Rigante D. A spectrum of inflammation and demyelination in acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) of children. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2015;14(10):923–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2015.06.002>

41. Yeshokumar AK, Narula S, Banwell B. Pediatric multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* [Internet]. 2017;30(3):216–21. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00019052-201706000-00004>

42. Gorman MP, Healy BC, Polgar-Turcsanyi M, Chitnis T. Increased relapse rate in pediatric-onset compared with adult-onset multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009;66(1):54–9.

43. Polman, CH; Reingold, SC; Edan G et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the McDonald criteria. *J Neurol* [Internet]. 2005;58(1):840–6. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71229691>

44. Hintzen RQ, Dale RC, Neuteboom RF, Mar S, Banwell B. Pediatric acquired CNS demyelinating syndromes Features associated with multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S67–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572864>

45. Banwell B, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M. Multiple sclerosis in children: clinical diagnosis, therapeutic strategies, and future directions. *Lancet Neurol*. 2007;6:887–902.
46. Collongues N, Marignier R, Zéphir H, Papeix C, Fontaine B, Blanc F, et al. Long-term follow-up of neuromyelitis optica with a pediatric onset. *Neurology*. 2010;75(12):1084–8.
47. Rostasy K, Bajer-Kornek B, Venkateswaran S, Hemingway C, Tardieu M. Differential diagnosis and evaluation in pediatric inflammatory demyelinating disorders. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S28–37. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002878>
48. Chabas D, Ness J, Belman A, Yeh EA, Kuntz N, Gorman MP, et al. Younger children with MS have a distinct CSF inflammatory profile at disease onset. *Neurology*. 2010;74(5):399–405.
49. Waldman A, Ghezzi A, Bar-Or A, Mikaeloff Y, Tardieu M, Banwell B. Multiple sclerosis in children: An update on clinical diagnosis, therapeutic strategies, and research. *Lancet Neurol* [Internet]. 2014;13(9):936–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70093-6)
50. Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 2007;6(September):805–15.
51. Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica

spectrum disorders. *Neurology* [Internet]. 2015;85(2):177–89. Available from: <http://www.neurology.org/content/85/2/177.abstract?etoc>

52. Bar-Or A, Hintzen RQ, Dale RC, Rostasy K, Brück W, Chitnis T. Immunopathophysiology of pediatric CNS inflammatory demyelinating diseases. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S12–9. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002821>

53. Costa, B ; Passos, G; Becker J, Sato D. MOG-IgG associated optic neuritis is not multiple sclerosis. 2017;(July):687–91.

54. Pandit L, Mustafa S, Malli C, D’Cunha A. Mycophenolate mofetil in the treatment of multiple sclerosis: A preliminary report. *Neurol India* [Internet]. 2014;62(6):646. Available from: <http://www.neurologyindia.com/text.asp?2014/62/6/646/149390>

55. Montcuquet A, Collongues N, Papeix C, Zephir H, Audoin B, Laplaud D, et al. Effectiveness of mycophenolate mofetil as first-line therapy in AQP4-IgG, MOG-IgG, and seronegative neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult Scler J*. 2017;23:1377–84.

56. Awad A, Stü O. Cyclophosphamide in multiple sclerosis : scientific rationale , history and novel treatment paradigms. *Ther Adv Neurol Disord*. 2009;2(6):357–68.

57. Simone M, Chitnis T. Use of Disease-Modifying Therapies in Pediatric MS. *Curr Treat Options Neurol*. 2016;18:36.

58. Tardieu M, Banwell B, Wolinsky JS, Pohl D, Krupp LB. Consensus definitions for pediatric MS and other demyelinating disorders in childhood.

Neurology [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S8–11. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000002877>

59. Junqueira LC; Carneiro J; Histologia Básica texto e atlas. Luiz Carlos Uchoa Junqueira_ José Carneiro-, editor. Guanabara koogan; 2013.

60. Murphy K. Imunobiologia de Janeway. 8ª Edição. Artmed; 2014.

61. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, et al. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. Hum Mol Genet. 2006;15(18):2813–24.

62. Baranzini SE, Nickles D. Genetics of multiple sclerosis : swimming in an ocean of data. Curr Opin Neurol. 2012;25:239–45.

63. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. N Engl J Med [Internet]. 2007;357:851–62. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:New+engla+n+d+journal#0>

64. Waubant E, Ponsonby A-L, Pugliatti M, Hanwell H, Mowry EM, Hintzen RQ. Environmental and genetic factors in pediatric inflammatory demyelinating diseases. Neurology [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S20–7. Available from: <http://www.neurology.org/lookup/doi/10.1212/WNL.0000000000003029>

65. Vargas-Lowy D, Chitnis T. Pathogenesis of pediatric multiple sclerosis. J Child Neurol. 2012;27(11):1394–407.

66. Van Haren K, Waubant E. Therapeutic advances in pediatric multiple sclerosis. *J Pediatr* [Internet]. 2013;163(3):631–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.04.028>

67. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(9):545–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3871>

68. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, et al. Interleukin 7 receptor α chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007;39(9):1083–91.

69. Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Lancet Neurol* [Internet]. 2015;14(3):263–73. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70267-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70267-4)

70. Gustavsen S, Søndergaard HB, Oturai DB, Laursen B, Laursen JH, Magyari M. Shift work at young age is associated with increased risk of multiple sclerosis in a Danish population. *Mult Scler Relat Disord* [Internet]. 2016;9:104–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2016.06.010>

71. Pierson E, Simmons SB, Castelli L, Goverman JM. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev*. 2012;248(1):205–15.

72. Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Immunology* [Internet]. 2012;12(9):623–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3265>

73. Frischer JM, Bramow S, Dal-bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132:1175–89.

74. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, Sirota M, Wang S, Pitts SJ, et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med*. 2014;6(248):1–11.

75. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Venken K, Hellings N, Broekmans T, 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. *J Immunol*. 2008;180:6411–20.

76. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens J-L, Stinissen P. 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. *J Immunol* [Internet]. 2008;180(9):6411–20. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.180.9.6411>

77. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2014;10:225–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.37>

78. Schreiner B, Becher B. Perspectives on cytokine-directed therapies in multiple sclerosis. *Swiss Med Wkly*. 2015;145(October):1–9.

79. Cala CM, Moseley CE, Steele C, Dowdy SM, Cutter GR, Ness JM, et al. T cell cytokine signatures: Biomarkers in pediatric multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* [Internet]. 2016 Aug 15 [cited 2017 May 8];297:1–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165572816300923>
80. Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* [Internet]. 2015;74(1):5–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
81. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *www.thelancet.com/neurology* [Internet]. 2015 [cited 2017 Dec 2];14:406–19. Available from: https://ac.els-cdn.com/S1474442214703059/1-s2.0-S1474442214703059-main.pdf?_tid=515daf3c-d76d-11e7-9120-00000aacb360&acdnat=1512225198_a0744f7dc4b80d8099f756df47be9a75
82. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(9):913–9.
83. Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th1, Th17, and Th9 Effector Cells Induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis with Different Pathological Phenotypes. *J Immunol* [Internet]. 2009;183(11):7169–77. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0901906>
84. Chen M, Gran B, Costello K, Johnson K, Martin R, Dhib-Jalbut S. Glatiramer acetate induces a Th2-biased response and crossreactivity with myelin basic protein in patients with MS. *Mult Scler*. 2001;7(4):209–19.

85. Ochi H, Osoegawa M, Wu XM, Minohara M, Horiuchi I, Murai H, et al. Increased IL-13 but not IL-5 production by CD4-positive T cells and CD8-positive T cells in multiple sclerosis during relapse phase. *J Neurol Sci*. 2002;201(1–2):45–51.
86. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2013;2(0):0. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2013.58>
87. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2006;177(1):566–73. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.177.1.566>
88. Guerrero-Garcia J de J, Castaneda-Moreno VA, Torres-Carrillo N, Munoz-Valle JF, Bitzer-Quintero OK, Ponce-Regalado MD, et al. Interleukin-17A Levels Vary in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients in Association with Their Age, Treatment and the Time of Evolution of the Disease. *Neuroimmunomodulation* [Internet]. 2015;23(1):8–17. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000441004>
89. Chen M-L, Yan B-S, Bando Y, Kuchroo VK, Weiner HL. Latency-Associated Peptide Identifies a Novel CD4+CD25+ Regulatory T Cell Subset with TGF- β -Mediated Function and Enhanced Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* [Internet]. 2008;180(11):7327–37. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.180.11.7327>
90. Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D. Aspectos históricos de la esclerosis múltiple. *Rev Neurol*

[Internet]. 2002;34(4):379–83. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12022056>

91. Corporation IBM. IBM SPSS Decision Trees 20. 2011.

92. Fernández-Paredes L, Casrouge A, Decalf J, de Andrés C, Villar LM, Pérez de Diego R, et al. Multimarker risk stratification approach at multiple sclerosis onset [Internet]. Vol. 181, Clinical Immunology. Elsevier Inc; 2017. 43-50 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2017.05.019>

93. Karussis D, Petrou P. The spectrum of post-vaccination inflammatory CNS demyelinating syndromes. Autoimmun Rev [Internet]. 2014;13(3):215–24. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.autrev.2013.10.003>

94. Casper TC, Rose JW, Roalstad S, Waubant E, Aaen G, Belman A, et al. The US Network of Pediatric Multiple Sclerosis Centers: Development, Progress, and Next Steps. J Child Neurol [Internet]. 2015;30(10):1381–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25270659>

95. van der Vuurst de Vries RM, van Pelt ED, Mescheriakova JY, Wong YYM, Ketelslegers IA, Siepman TAM, et al. Disease course after clinically isolated syndrome in children versus adults: a prospective cohort study. Eur J Neurol. 2017;24(2):315–21.

96. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). Neurology [Internet]. 1983;33(11):1444–52. Available from:
<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.33.11.1444>

97. Banwell B, Bar-or A, Arnold DL, Sadovnick D, Narayanan S, MCGowan M, et al. Clinical , environmental , and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination : a prospective national cohort study. *Lancet Neurol* [Internet]. 2011;10(5):436–45. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70045-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70045-X)

98. Banwell B, Arnold DL, Tillema J-M, Rocca MA, Filippi M, Weinstock-Guttman B, et al. MRI in the evaluation of pediatric multiple sclerosis. *Neurology* [Internet]. 2016 Aug 30 [cited 2017 May 8];87(9 Supplement 2):S88–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27572868>

99. Su JJ, Osoegawa M, Matsuoka T, Minohara M, Tanaka M, Ishizu T, et al. Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: Correlation with MRI findings. *J Neurol Sci*. 2006;243:21–30.

100. Hegen H, Adrianto I, Lessard CJ, Millonig A, Bertolotto A, Comabella M, et al. Cytokine profiles show heterogeneity of interferon- response in multiple sclerosis patients. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* [Internet]. 2016;3(2):e202–e202. Available from: <http://nn.neurology.org/cgi/doi/10.1212/NXI.0000000000000202>

101. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, De Andrés C, Seyfferth A, Ramos-Medina R, Alonso B, et al. Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10(6):1–21.

102. Buttmann M, Merzyn C, Rieckmann P. Interferon-beta induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004;156(1–2):195–203.

103. Michael BD, Elson L, Griffiths MJ, Faragher B, Borrow R, Solomon T, et al. Post-acute serum eosinophil and neutrophil-associated cytokine/chemokine profile can distinguish between patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis; and identifies potential pathophysiological mechanisms – A pilot study. *Cytokine* [Internet]. 2013 Oct [cited 2017 Dec 23];64(1):90–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613006340>

104. Franciotta D, Martino G, Zardini E, Furlan R, Bergamaschi R, Andreoni L, et al. Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. *J Neuroimmunol*. 2001;115:192–8.

105. Sellebjerg F, Krakauer M, Hesse D, Ryder LP, Alsing I, Jensen PEH, et al. Identification of new sensitive biomarkers for the in vivo response to interferon- β treatment in multiple sclerosis using DNA-array evaluation. *Eur J Neurol*. 2009;16(12):1291–8.

106. Comini-Frota ER, Teixeira AL, Angelo JPA, Andrade M V, Brum DG, Kaimen-Maciel DR, et al. Evaluation of serum levels of chemokines during interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients: a 1-year, observational cohort study. *CNS Drugs* [Internet]. 2011;25(11):971–81. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med7&NEWS=N&AN=22054120>

107. Han Q, Bagheri N, Bradshaw EM, Ha DA, Lauffenburger DA. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *PNAS*. 2012;109(5):1607–12.

108. Fragoso YD, Brito ML, De Macedo N, Oleschko W, Bidin JB, Diniz DS, et al. Multiple sclerosis starting before the age of 18 years: the Brazilian experience. *Arq neuropsiquiatria* [Internet]. 2013;71(10):783–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212515>

XI- Anexos

Anexo 1:

INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo de Marcadores Diagnósticos para Prognóstico e Abordagem Terapêutica nas Doenças Desmielinizantes na Infância: Estudo de coorte

Pesquisador: Tania Regina Dias Saad Salles

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 02636812.0.0000.5269

Instituição Proponente: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

Patrocinador Principal: Instituto Fernandes Figueira - IFF/ FIOCRUZ - RJ/ MS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.431.700

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de coorte para avaliar o uso de marcadores imunológicos como preditivos do curso evolutivo de Doenças Desmielinizantes na Infância, de modo a possibilitar o possibilitando o monitoramento da resposta terapêutica. Serão considerados como participantes todos os pacientes com idade entre 1 e 16 anos com suspeita diagnóstica de doença desmielinizante, segundo as definições do consenso do International Pediatric MS Study Group (Krupp e cols., 2007) em qualquer fase da doença, admitidos no ambulatório de Neurologia Infantil específico para tratamento das doenças desmielinizantes na infância ou nas Unidades de Internação do Instituto Fernandes.

Figueira

Objetivo da Pesquisa:

Solicitar emenda para extensão de prazo para realização da pesquisa.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisador apresentou justificativas para solicitação da extensão de prazo

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2552-8491 **E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.431.700

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_646054 E1.pdf	04/02/2016 18:38:37		Aceito
Outros	Carta_emenda.docx	04/02/2016 18:34:47	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_compromisso_Gabriel_Gamarano.jpg	04/02/2016 18:21:26	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO.pdf	04/02/2016 15:05:28	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_compromisso_Zilton.jpg	04/02/2016 15:01:50	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_Assentimento.pdf	13/01/2016 15:08:10	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/01/2016 14:59:24	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_compromisso_Orli_Carvalho.jpg	21/12/2015 15:58:44	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Outros	Termo_de_Autorizacao_Imagem.jpg	17/12/2015 12:27:44	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Outros	Tese.docx	16/12/2015 17:40:25	Tania Regina Dias Saad Salles	Aceito
Outros	declaração_Depto Pesquisa..pdf	06/11/2012 13:25:36		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto1.pdf	06/11/2012 13:23:50		Aceito
Outros	Scan0004.JPG	30/10/2012 11:42:33		Aceito

Endereço: RUI BARBOSA, 716
 Bairro: FLAMENGO CEP: 22.250-020
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2554-1730 Fax: (21)2552-8491 E-mail: cepiff@iff.fiocruz.br

**INSTITUTO FERNANDES
FIGUEIRA - IFF/ FIOCRUZ - RJ/
MS**



Continuação do Parecer: 1.431.700

Outros	ANEXO 2 Protocolo para Abordagem dos Pacientes com Doenças Desmielinizantes no Ambulatório ou Unidade de Internação do IFF.doc	29/10/2012 17:29:17		Aceito
Outros	PROJETO DOENÇAS DESMIELINIZANTES NA INFÂNCIA IFF Tania Saad Salles.doc	29/10/2012 17:23:52		Aceito
Outros	ANEXO 1 PORTARIA ANVISA 2010 EDSS.pdf	29/10/2012 16:37:18		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO 3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDOcomcabecalho24102012.doc	29/10/2012 16:32:11		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

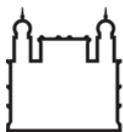
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 01 de Março de 2016

**Assinado por:
maria elisabeth lopes moreira
(Coordenador)**

Endereço: RUI BARBOSA, 716
Bairro: FLAMENGO **CEP:** 22.250-020
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2554-1730 **Fax:** (21)2552-8491 **E-mail:** cepiff@iff.fiocruz.br

Anexo 2:

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**IFF**INSTITUTO NACIONAL
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE | FERNANDES FIGUEIRA**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Título da Pesquisa: ESTUDO DE MARCADORES DIAGNÓSTICOS PARA
PROGNÓSTICO E ABORDAGEM TERAPÊUTICA NAS DOENÇAS
DESMIELINIZANTES NA INFÂNCIA: ESTUDO DE COORTE**

Pesquisador Responsável: Tania Regina Dias Saad Salles. MD, PhD,

Instituição Responsável: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira - FIOCRUZ

Endereço: Av. Rui Barbosa n^o 716, Flamengo – Rio de Janeiro – RJ.
Contato: 2554-1805

Nome do sujeito: _____ Prontuário:

ATENÇÃO:

Você e seu filho (a) estão sendo convidados a participar do projeto de pesquisa acima referido por seu filho(a) apresentar sintomas que sugerem uma doença do sistema nervoso que ataca o revestimento dos nervos chamado mielina. Antes de assinar este documento, é necessário que você leia com atenção as informações abaixo. Caso não entenda alguma(s) palavra(s) ou a ideia do texto, peça explicações aos médicos da Neurologia indicados no final do documento.

Objetivo do estudo: Estudar mais detalhadamente nas crianças as doenças que alteram a mielina dos nervos. A mielina é como se fosse o encapamento de um fio elétrico em volta dos nossos nervos. Com isso se pretende conhecer melhor o que causa esta alteração e assim saber qual o melhor remédio para tratar o problema de cada criança afetada por este grupo de doenças que pode ter várias

formas de se manifestar - Encefalomielite Disseminada Aguda (ADEM), Esclerose Múltipla (EM), Neuromielite Óptica (NMO) e Síndrome Clínica Isolada (SCI) que compreendem a Mielite Transversa (MT) e a Neurite óptica (NO)

Procedimentos: Para diagnosticar este grupo de doenças, além da história clínica e do exame físico da criança, são necessários alguns exames complementares que auxiliam inclusive a distinguir o tipo da doença – se EM, NMO, ADEM ou SCI.

Um dos mais importantes é a ressonância magnética do crânio e da medula. É um exame de imagem do sistema nervoso central fundamental para o diagnóstico. É realizado num aparelho que parece um túnel. Causa muito menos irradiação que os exames de radiografia e tomografia e dá mais informações porque enxerga o que está acontecendo no cérebro e na medula (espinha) que fica por dentro da coluna.

Para que essas imagens se formem e mostrem se a doença está na fase de surto (aguda) ou remissão (crônica) é preciso o uso de contraste injetado pela veia do braço. O contraste é muito seguro e existem pouquíssimos casos de alergia à ele. Por isso e também por que o exame é demorado (cerca de 40 minutos) e a criança não pode se mexer, pode ser necessário o uso de anestesia nas crianças menores de 7 (sete) anos e naquelas muito agitadas, o que será feito por anestesista (médico especializado).

Outro exame útil para o diagnóstico e o tratamento das doenças desmielinizantes é o estudo de substâncias que causam inflamação no nosso organismo e alguns marcadores de células brancas ou de defesa. Estas substâncias estão no sangue e no líquido da espinha. Por isso será necessário colher sangue na veia do braço de três em três meses e retirar líquido da espinha (punção lombar) quando a doença reativar-se.

O sangue, depois de examinado, será guardado e poderá ser usado depois em outras pesquisas parecidas, mas somente após avaliação pelo *Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)*, que poderá dispensar a assinatura de um novo Termo de Consentimento como este.

Na dependência do quadro clínico, poderão ser solicitados ainda, exames de eletrofisiologia, tais como potenciais evocados auditivo e visual, bem como potencial somatossensitivo de quatro membros que dão informações sobre as funções da audição, visão e medula. O paciente será submetido também a exames de vista (oftalmológico), como: fundo de olho, acuidade visual e tomografia de coerência ocular.

Para melhor acompanharmos a alteração causada no sistema nervoso pela doença, o seu filho será ainda submetido a avaliações pela fisioterapia através da CIF-CJ (Classificação Internacional de Funcionalidade), que é indolor e poderá ser filmado. Será também avaliado com testes de linguagem próprios a idade dele(a) pela equipe da fonoaudiologia.

A doença de seu filho pode alterar o ritmo e a qualidade da vida dele e também de sua família, por isso será necessário que vocês respondam a um questionário,

chamado PedsQL, que descreverá se isso está acontecendo ou não e de que forma.

Riscos: A coleta de sangue é comum na Pediatria e, de modo geral, não dá nenhuma complicação, exceto pequeno coágulo ou mancha roxa, resolvidos espontaneamente ou com compressas mornas, sem causar qualquer ameaça ou complicação física e/ou emocional para o paciente e sua família.

A retirada do líquido da espinha também é de fácil execução na Pediatria, pois é o mesmo procedimento usado para diagnosticar as meningites. É feita com a criança deitada de lado ou sentada na maca. Utiliza-se anestesia local nas costas, no local onde será introduzida a agulha, para que a criança não sinta dor. Este tipo de anestesia é feito pelo próprio pediatra, sem necessidade do anestesista. Pode deixar pequeno hematoma local, que igualmente regride com o passar dos dias.

Os exames eletrofisiológicos não têm contraindicações, não são dolorosos, nem tem efeitos indesejáveis, exceto pelo tempo necessário para sua realização e poderão ser feitos em dias diferentes, caso seu filho se sinta cansado. O mesmo é verdadeiro para o questionário de qualidade de vida e a avaliação fonoaudiológica, podem ser cansativos e poderão ser realizados em várias sessões.

Benefícios: Pela realização do exame de ressonância será possível confirmar se se trata de doença desmielinizante, qual o tipo (EM, NMO, SCI ou ADEM) e em que fase a mesma se encontra, o que é muito importante para decidir qual o melhor remédio.

Com a dosagem das substâncias do sangue e do líquido da espinha será possível conhecer melhor o problema da inflamação que causou a perda de mielina para essas crianças e isso também ajuda na escolha do medicamento que melhor bloqueie a formação dessa proteína nos portadores de doenças desmielinizantes na infância.

Todo este acompanhamento clínico, fisioterápico e fonoaudiológico, além dos estudos da qualidade de vida poderão permitir a identificação precoce de alterações da função do sistema nervoso, permitindo uma ação de médicos e outros profissionais de saúde que ajudem na recuperação de seu filho.

Confidencialidade: Os resultados deste estudo nunca revelarão o nome dos pacientes ou voluntários nele envolvidos.

Participação voluntária: O consentimento dado pelo(a) senhor(a) ou pelo responsável legal para que seu filho participe do estudo é livre e voluntário, não havendo qualquer forma de pagamento por parte do Hospital ou dos médicos. Caso o senhor(a) não queira que seu filho participe do estudo, ainda assim ele

poderá se tratar aqui no hospital. Se depois de assinar este termo sua família decidir que não quer mais participar, o tratamento também poderá ser mantido.

Os participantes do estudo manterão acompanhamento no Setor de Neurologia Infantil ainda que a pesquisa termine, até que seu filho complete dezoito anos de idade, pelo fato de que até o momento não existe cura definitiva para este grupo de doenças.

Você receberá uma via idêntica deste documento, assinada pelo pesquisador deste estudo.

Sua participação no estudo não implicará em custos adicionais, não terá qualquer despesa com a realização dos procedimentos previstos neste estudo. Também não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação.

É garantido o direito de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, mas não das sequelas próprias da doença.

Em caso de dúvidas: Em caso de dúvida, por favor, entre em contato com o CEP (Comitê em Ética em Pesquisa) do IFF, na Avenida Rui Barbosa, 716, 1º andar; telefones: 2552-1730, 2552-8491(fax), email: cepiff@iff.fiocruz.br ou com Dra. Tania Saad ou Dra. Alessandra Augusta Barroso Penna e Costa, médicas responsáveis pelo projeto no Setor de Neurologia Infantil, no mesmo endereço, pelo telefone: 2554-1805.

Declaro que li e entendi todo o conteúdo deste *Termo de Consentimento*, depois de ter formulado as perguntas necessárias e recebido as devidas respostas. Portanto, permito a participação de meu filho(a) na investigação proposta. Estou ciente ainda que poderei voltar a fazer qualquer questionamento durante a duração do estudo ou solicitar a exclusão de meu filho do presente estudo a qualquer momento, sem prejuízo de seu acompanhamento.

Local: _____; Data: _____

Nome completo do voluntário: _____

Endereço: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Nome da testemunha: _____

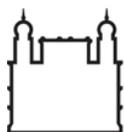
Documento: _____, Telefone: _____

Assinatura da testemunha: _____

Investigador que obteve o TCLE: _____

Assinatura do Investigador: _____

Coordenadora do Projeto/Tania Regina Dias Saad Salles _____

Anexo 3:

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**IFF**INSTITUTO NACIONAL | FERNANDES FIGUEIRA
DE SAÚDE DA MULHER, DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO PARA CRIANÇAS E
ADOLESCENTES ENTRE 6 E 16 ANOS**

**Instituição: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do
Adolescente Fernandes Figueira - FIOCRUZ.**

**Título do Projeto: Estudo de Marcadores Diagnósticos para Prognóstico e
Abordagem Terapêutica nas DOENÇAS DESMIELINIZANTES NA
INFÂNCIA: Estudo de Coorte**

Pesquisador Responsável: Tania Regina Dias Saad Salles. MD, PhD

Assentimento informado para

Você tem um problema de saúde que ataca o encapsamento dos seus nervos.

Os nervos são como fios e geralmente eles são revestidos por uma capinha de gordura chamada MIELINA.

Quando esta capinha se quebra ou se inflama, você fica fraco, não consegue coordenar seus movimentos, mexer suas mãos e pernas, pode ficar sem ouvir, sem enxergar, tem que parar de brincar, estudar e jogar videogame.

Antes, achávamos que esse problema só dava em gente grande, mas agora descobrimos que amigos da sua idade ou menores, também podem ter. Por isso você e outros meninos e meninas de 6 à 16 anos que também têm este problema, estão sendo convidados a participar deste estudo. Queremos descobrir por que seus nervos ficam fracos e não obedecem a seus comandos. É como se fosse uma pesquisa da escola e vai nos ajudar a entender como esse problema acontece para trata-lo melhor e você poder crescer bonito/a e feliz. Explicamos isso para os seus pais também e eles vão assinar estes papeis.

Antes de assinar veja se entendeu tudinho. Se não, pergunte pra mim. Vou tirar as suas dúvidas. Se não quiser, não precisa assinar hoje. Você que conversar primeiro com seus pais?

Durante a pesquisa você vai precisar colher um pouquinho de sangue do braço a cada três meses e quando acontecer de você ficar se sentindo fraco, doente, teremos que examinar o líquido que está dentro da sua cabeça e da sua espinha, através de um exame chamado punção lombar, isto é, vamos tirar um pouquinho desse líquido das suas costas. É como se fosse uma injeção mais acima do bumbum. Podemos colocar aquele papelzinho com anestésico se você preferir.

Também precisará fazer o exame de ressonância magnética, que tira fotos do seu cérebro e da sua espinha por dentro. É uma máquina grande que parece um túnel. Lá dentro é muito barulhento e você não vai poder se mexer nem um pouquinho. Por isso, talvez seja melhor fazer o exame com anestesia; aquele remedinho que faz você dormir e quando você acordar já acabou tudo.

Esse exame é muito importante para vermos se está tudo bem com a capinha dos seus fios, os nervos. Lembra?

Também será preciso fazer um exame que coloca uns fones no ouvido e outro em que vamos pedir pra você ficar olhando para um monte de quadradinhos pretos e brancos e depois olhar numa janelinha, bem quietinho. Esses exames vão nos dizer como estão sua vista e sua audição, se você está ouvindo bem.

Vamos pedir pra você fazer uns testes que parecem uma forma de ginástica e também será preciso você ler um pouquinho, mas calma. Não é uma prova. Você nunca será reprovado aqui. Estamos todos querendo te ajudar a ficar bem. E por falar em ficar bem, queremos saber como você se sente desde que soube que tinha este probleminha nos nervos. Mudou muita coisa na sua vida? Você está se sentindo triste? Ou está zangado, com raiva?

Não falaremos para outras pessoas que você está nesta pesquisa e também não daremos informações sobre você à ninguém que não faça parte desse trabalho.

Os resultados dos seus exames estarão no seu prontuário.

Se você quiser parar de fazer parte do grupo de pesquisa, é só dizer que ainda assim você poderá continuar a ser tratado por nós neste hospital.

E agora, vamos assinar os papéis? Alguma dúvida?

Já sabe, se você começar a se sentir fraco, não estiver enxergando bem, ouvindo quase nada, informe logo para seus pais. Eles têm os nossos telefones e irão nos avisar. Rapidinho começaremos a tratar de você e logo, logo você ficará bom de novo.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa “Estudo de Marcadores Diagnósticos para Prognóstico e Abordagem Terapêutica nas Doenças Desmielinizantes na Infância: Estudo de Coorte” e entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li e concordo em participar da pesquisa.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

Assinatura do Coordenador do Projeto: Tania Regina Dias Saad Salles

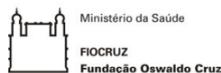
Telefones para contato: (IFF): 2554-1805; 2554-1700, ramal: 1805.

Anexo 4:

Definições do consenso do International Pediatric MS Study Group (Krupp et al., 2007; 2013)

Critérios de 2007 e 2013 das Doenças Desmielinizantes na Infância:		
Doença:	2007	2013
Síndrome Clínica Isolada	Primeiro evento mono ou multifocal desmielinizante do SNC; Encefalopatia ausente.	• Primeiro evento mono ou multifocal desmielinizante do SNC; Encefalopatia ausente a não ser por conta de febre
ADEM monofásico	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiro evento clínico polissintomático de causa presumidamente inflamatória que afete áreas multifocais do SNC; • Encefalopatia presente; • RNM típica: lesões grandes, $\geq 1-2$ cm em substância branca, envolvimento substância cinzenta (tálamo ou gânglios da base) frequente; • Sintomas novos ou flutuantes e lesões à RNM dentro de 3 meses dos primeiros sintomas fazem parte do evento agudo do ADEM. 	<ul style="list-style-type: none"> • Primeiro evento clínico polissintomático de causa presumidamente inflamatória; • Encefalopatia que não seja explicada por febre deve estar presente; • RNM típica: lesões difusas, pouco delimitadas, grandes, $\geq 1-2$ cm, envolvendo predominantemente substância branca. Lesões hipointensas em T1 são raras. Lesões de substância cinzenta (tálamo ou gânglios da base) podem estar presentes; • Ausência de novos sinais, sintomas ou lesões à RNM após 3 meses do evento inicial.
ADEM recorrente	• Novo evento de ADEM com recorrência dos sintomas iniciais, três meses ou mais, após o evento inicial de ADEM.	<ul style="list-style-type: none"> • Agrupado na classificação de ADEM multifásico. *A categoria foi eliminada por sua baixa frequência.
ADEM multifásico	• Novo evento de ADEM que envolva novas áreas anatômicas do SNC e que ocorra após 3 meses do evento inicial de ADEM e, ao menos um mês após terminada a corticoterapia;	• Novo evento de ADEM, que ocorra a partir de 3 meses dos sintomas iniciais e que seja associado a sintomas clínicos e achados à RNM novos ou reemergentes. O tempo em relação a corticoterapia não é mais pertinente.
Esclerose Múltipla	Qualquer dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Múltiplos eventos clínicos desmielinizantes do SNC, separados em tempo e espaço; • Evento clínico único associado aos critérios de Disseminação no Espaço e subsequentes alterações à RNM consistentes com disseminação no tempo de acordo com os critérios de McDonald de 2010; • Um episódio com características clínicas de ADEM não pode ser considerado como o primeiro evento de Esclerose Múltipla. 	Qualquer dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Dois ou mais eventos clínicos do SNC não-encefalite, separados por mais de 30 dias, envolvendo mais de uma área do SNC; Evento clínico único e características à RNM que preencham os critérios de McDonald de 2010 para disseminação no Espaço e no Tempo (critério relativo à disseminação no tempo apenas aplicável a crianças ≥ 12 anos e apenas a casos sem evento inicial de ADEM). • ADEM seguido após ≥ 3 meses de evento clínico que não seja encefalite, com novas lesões à RNM compatíveis com EM.
NMO	Necessita todos os critérios: <ul style="list-style-type: none"> • Neurite óptica • Mielite aguda • Ao menos um dos 2 critérios de suporte: <ul style="list-style-type: none"> • Lesão contígua em medula ≥ 3 segmentos • Positividade do anticorpo Antiaquaporina 4 	Necessita todos os critérios: <ul style="list-style-type: none"> • Neurite óptica • Mielite aguda • Ao menos um dos 2 critérios de suporte: <ul style="list-style-type: none"> • Lesão contígua em medula ≥ 3 segmentos • Positividade do anticorpo Antiaquaporina 4 • RNM cerebral com lesões que não preencham critérios para EM.

Anexo 5:



Data da coleta: ___ / ___ / ___

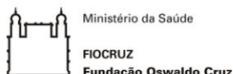
Identificação n° _____

Prontuário n° _____

Coletado por: _____

SCORE EDSS

Escore	Características
0	Exame neurológico normal (todos os SF grau 0; cerebral, grau 1 aceitável)
1,0	Sem incapacidade (1 SF grau 1)
1,5	Sem incapacidade (2 SF grau 1)
2,0	Incapacidade mínima em 1 SF (1 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)
2,5	Incapacidade mínima em 2 SF (2 SF grau 2, outros grau 0 ou 1)
3,0	Incapacidade moderada em 1 SF (1 SF grau 3, outros grau 0 ou 1) ou incapacidade discreta em 3 ou 4 SF (3/4 SF grau 2, outros grau 0 ou 1). Deambulando plenamente.
3,5	Deambulação plena, com incapacidade moderada em 1SF (1 SF grau 3) e 1 ou 2 SF grau 2; ou 2SF grau 3; ou 5 SF grau 2 (outros 0 ou 1)
4,0	Deambulação plena, até 500 m sem ajuda ou descanso (1 SF grau 4)
4,5	Deambulação plena, até 300 m sem ajuda ou descanso. Com alguma limitação da atividade ou requer assistência mínima (1 SF grau 4, outros 0 ou 1)
5,0	Deambulação até 200 m sem ajuda ou descanso. Limitação nas atividades diárias (equivalentes são 1 SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinação de graus menores excedendo o escore 4.0)
5,5	Deambulação até 100 m sem ajuda ou descanso. Incapacidade impedindo atividades plenas diárias (equivalentes são 1SF grau 5, outros 0 ou 1; ou combinações de graus menores excedendo o escore 4.0)
6,0	Assistência intermitente ou com auxílio unilateral constante de bengala, muleta ou suporte (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)
6,5	Assistência bilateral (equivalentes são mais que 2 SF graus 3+)
7,0	Não anda 5 m mesmo com ajuda. Restrito a cadeira de rodas. Transfere da cadeira para cama (equivalentes são combinações com mais que 1 SF 4+, ou piramidal grau 5 isoladamente)
7,5	Consegue apenas dar poucos passos. Restrito à cadeira de rodas. Necessita ajuda para transferir-se (equivalentes são combinações com mais que 1 SF grau 4+)
8,0	Restrito ao leito, mas pode ficar fora da cama. Retém funções de autocuidado; bom uso dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)
8,5	Restrito ao leito constantemente. Retém algumas funções de autocuidade e dos braços (equivalentes são combinações de vários SF grau 4+)
9	Paciente incapacitado no leito. Pode comunicar, não come, não deglute (equivalentes é a maioria de SF grau 4+)
9,5	Paciente totalmente incapacitado no leito. Não comunica, não come, não deglute (equivalentes são quase todos de SF grau 4+)
10	Morte por esclerose múltipla
SCORE FINAL	



SISTEMA FUNCIONAIS PARA O EDSS
(circular a resposta)

Funções Piramidais

- 0. Normal
- 1. Sinais anormais sem incapacidade motora
- 2. Incapacidade mínima
- 3. Discreta ou moderada paraparesia ou hemiparesia; monoparesia grave
- 4. Paraparesia ou hemiparesia acentuada; quadriparesia moderada; ou monoplegia
- 5. Paraplegia, hemiplegia ou acentuada quadriparesia
- 6. Quadriplegia
- V. Desconhecido

Funções do Tronco Cerebral

- 0. Normal
- 1. Somente sinais anormais
- 2. Nistagmo moderado ou outra incapacidade leve
- 3. Nistagmo grave, acentuada paresia extraocular ou incapacidade moderada de outros cranianos
- 4. Disartria acentuada ou outra incapacidade acentuada
- 5. Incapacidade de deglutir ou falar
- V. Desconhecido

Funções Vesicais

- 0. Normal
- 1. Sintomas urinários sem incontinência
- 2. Incontinência {ou igual uma vez por semana
- 3. Incontinência }ou igual uma vez por semana
- 4. Incontinência diária ou mais que 1 vez por dia
- 5. Caracterização contínua
- 6. Grau para bexiga e grau 5 para disfunção retal
- V. Desconhecido

Funções mentais

- 0. Normal
- 1. Alterações apenas do humor
- 2. Diminuição discreta da mentação
- 3. Diminuição normal da mentação
- 4. Diminuição acentuada da mentação (moderada síndrome cerebral crônica)
- 5. Demência ou grave síndrome cerebral crônica
- V. Desconhecido

Funções Cerebelares

- 0. Normal
- 1. Sinais anormais sem incapacidade
- 2. Ataxia discreta em qualquer membro
- 3. Ataxia moderada do tronco ou de membros
- 4. Incapaz de realizar movimentos coordenados devido à ataxia
- V. Desconhecido

Funções Sensitivas

- 0. Normal
- 1. Diminuição de sensibilidade ou estereognosia em 1-2 membros
- 2. Diminuição discreta de tato ou dor, ou da sensibilidade posicional, e/ou diminuição moderada da vibratória ou estereognosia em 1-2 membros; ou diminuição somente da vibratória em 3-4 membros
- 3. Diminuição moderada de tato ou dor, ou posicional, e/ou perda da vibratória em 1-2 membros; ou diminuição discreta de tato ou dor, e/ou diminuição moderada de toda propriocepção em 3-4 membros
- 4. Diminuição acentuada de tato ou dor, ou perda da propriocepção em 1-2 membros, ou diminuição moderada de tato ou dor e/ou diminuição acentuada da propriocepção em mais de 2 membros
- 5. Perda da sensibilidade de 1-2 membros; ou moderada da diminuição de tato ou dor e/ou perda da propriocepção na maior parte do corpo abaixo da cabeça
- V. Desconhecido

Funções intestinais

- 0. Normal
- 1. < obstipação diária e sem incontinência
- 2. Obstipação diária sem incontinência
- 3. Obstipação < uma vez por semana
- 4. Incontinência > uma vez por semana mas não diária
- 5. Sem controle de esfíncter retal
- 6. Grau 5 para bexiga e grau 5 para disfunção retal
- V. Desconhecido

Outras funções

- 0. Nenhuma
- 1. Qualquer outro achado devido à EM
- 2. Desconhecido

Anexo 6:

Protocolo para Abordagem dos Pacientes com Doenças Desmielinizantes no Ambulatório ou Unidade de Internação do IFF-FIOCRUZ

Uma vez que o paciente preencha critérios diagnósticos clínico, de imagem e/ou laboratoriais (sangue e líquido), será submetido a coleta de sangue para investigação complementar e diagnóstico diferencial. A seguir será iniciado o protocolo pré-pulsoterapia e instituído tratamento para o surto desmielinizante, considerando-se:

SURTO: Sinal e/ou sintoma neurológico novo OU piora de uma manifestação pré-existente por mais de 24 horas de duração. Observação objetiva ao exame neurológico ou relato subjetivo do paciente.

REMISSÃO – espontânea ou não, com ou sem morbidades residuais.

Protocolo PRÉ-PULSOTERAPIA: com Metilprednisolona Vermífugo (para erradicação de estrogiloides):

Cambendazol, 5mg/kg/ dose única, VO; ou

Tiabendazol, VO, em vários esquemas terapêuticos:

a) 25mg/kg/dia, durante 5 a 7 dias.

b) 50mg/kg/dia, em dose única, à noite. Dose máxima - 0,3g;

c) 10mg/dia, por 30 dias (esquema para auto-endoinfecção e déficit da imunidade celular);

ou

Albendazol, 400mg/dia, durante 3 dias, não recomendado em gestantes. Ivermectina, dose única, VO, obedecendo a escala de peso corporal:

15 a 24 kg - 1/2 cp; 36 a 50 kg - 1 1/2 cp;

25 a 35 kg - 1 cp; 51 a 65kg -2 cp;

65 a 79 kg -2 1/2 cp;

80 kg - 200 mg/kg).

Rastreio infeccioso e metabólico:

Hemograma Completo, PCR, Na⁺, K⁺, Glicemia, Hb Glicosilada, Uréia, Creatinina, TGO, TGP, Gama GT, T4L, TSH, EAS, Radiografias de tórax e seios da face

Controle durante o tempo de pulsoterapia: (Rozencwajg D, Einstein. 2008;6(4):491-6)

Pressão Arterial antes do início e a cada hora de infusão;

DXT matinal e ao final da infusão. Verificar também, antes do jantar se paciente internado.

Frequência cardíaca antes, durante e após a infusão.

Manter saturímetro acoplado, se possível.

A qualquer sinal de infecção, refazer rastreamento. *

A qualquer sinal de alteração, contactar equipe da Neurologia no ramal 1805.

Caso mantenha-se corticoide oral ou pulsoterapia prolongada, será necessária atenção quanto a reposição de Vitamina D, manutenção de Ranitidina ou Omeprazol, reposição de potássio sob a forma de xarope de KCl 6% ou na dieta, que também deverá ser hipossódica.

São indicados acompanhamentos da função tireoidiana (T4L, TSH), cardíaca

(Ecocardiograma) e da massa óssea (Densitometria), além de verificações de glicemia basal e pressão arterial

Tratamento das EXACERBAÇÕES E SURTOS (Manejo da fase dedesmielinização aguda): ?

Droga de 1ª Linha: Metilprednisolona IV (Solumedrol 500mg) sob a forma de pulsoterapia. Próprio para ADEM, EM, NMO ou MT.

Dose: **30mg/kg/dia**, máximo de **1000mg** em SG5% em infusão ao longo de 30–60 mins, por 3 dias consecutivos por semana (ciclos) e por 3-5 semanas, ou por 5 dias em ciclo único. (NÃO HÁ CONSENSO).

Restringir o uso de corticosteroides orais para pacientes que após pulsoterapia não apresentem resolução total dos sintomas. Caso indicado o uso do mesmo deve ser breve:

(Prednisona 1-2 mg/kg/dia nos primeiro 7 dias após pulsoterapia e a seguir iniciar redução retirando 10% da dose de 3/ 3 dias.

Droga de 2ª Linha: Imunoglobulina Humana –

Utilizada para surtos leves a moderados, para crianças com contraindicação a corticoterapia e naqueles com episódios frequentes de desmielinização, logo após o uso de corticosteroides ou na dependência dos mesmos. Também indicada para evento agudo de desmielinização que não apresenta melhora após terapias imunomoduladoras. Indicada para ADEM, EM, NMO ou MT.

Dose: **2g/kg** infundidos em 2-5 dias.

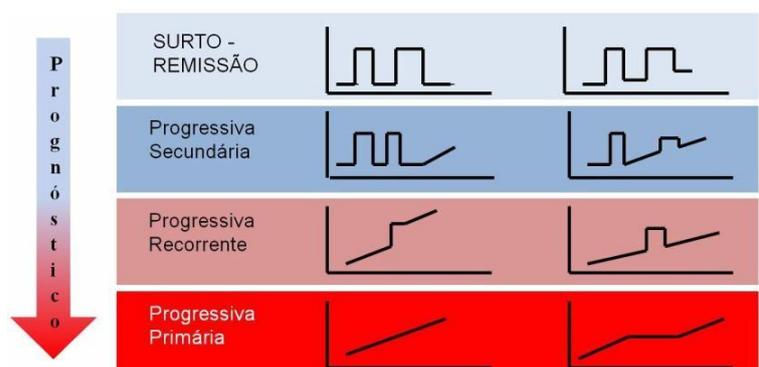
Intervenção de 3ª Linha: Plasmaférese:

É proposta em crianças para evitarem efeitos colaterais frequentes dos corticosteroides, para recaídas que acontecem em períodos curtos e naqueles com contraindicação formal ao uso de esteroides. Próprio para ADEM, EM, NMO ou MT ((Weinshenker BG, O'Brien PC, Petterson TM, et al.)

Mecanismo de Ação: Remove os prováveis agentes patogênicos implicados no processo inflamatório imunológico, tais como, auto-anticorpos, imunocomplexos e/ou complemento, do plasma. O plasma é trocado utilizando-se a técnica de filtração por membrana e substitui-se 2 a 3 litros por solução de albumina a 5% durante cada sessão e o paciente é submetido a 5 a 7 sessões, em geral em dias alternados.

Uma vez controlado o surto agudo de desmielinização, inicia-se o acompanhamento de longo prazo, visando definir o diagnóstico nosológico após o evento desmielinizante (NMO, EM, CIS), sobretudo se for o primeiro. Caso conclua-se, através da história clínica e dos exames complementares, tratar-se de esclerose Múltipla, será importante definir-se o tipo de progressão, o que nem sempre é possível logo após o primeiro surto, objetivando-se iniciar em tempo hábil o tratamento intercrítico descrito a seguir, para melhora de prognóstico de longo prazo

FORMAS EVOLUTIVAS DA Esclerose Múltipla



Tratamento Preventivo dos SURTOS e da PROGRESSÃO DA DOENÇA (Manejo da fase de desmielinização crônica):

Por que tratar entre as crises?

Evidências em adultos com EM mostram que: recaídas frequentes, intervalos curtos entre ataques e falha na recuperação de recaídas predizem grande probabilidade de incapacidade (mensurada pelo EDSS) e maior propensão a entrar na fase secundariamente progressiva da E.M na qual a incapacidade é inexorável, uma vez que a apoptose e a perda axonal são irreversíveis.

Como tratar?

Minipulsos mensais de corticoide

Tratamento Imunomodulador (Específico para E M Pediátrica)

---Interferons

---Acetato de Glatirâmer

Fundamentos

1. Modulam ou suprimem o Sistema Imunológico.
2. Indicadas para Esclerose Múltipla, especificamente.
3. Aprovadas pelo FDA para adultos e parcialmente para crianças.
4. As drogas modificadoras de doença visam reduzir a frequência de recaídas clínicas, atividade radiológica (RM) e previnem a progressão da incapacidade.
5. Alvo: células B e T envolvidas na fisiopatologia da EM.
6. Droga ideal: capacidade de poupar o restante do sistema imunológico.

Preparações de Interferon Beta (IFN-β)

1. Interferon Beta -1a

Aplicação SC (Rebif) Disponibilizado pela SESDECRJ.

ano. Interferon Beta- 1a SC (Rebif):

Redução nas taxas de recaída de 1,9 a 0,8 /ano

Dose: adultos = 44 mcg 3x/semana; criança: começa com 25% dose/ mês.

Efeitos colaterais frequentes:

reações no local de injeção (71%), sintomas flu-like (65%), sintomas gastrointestinais (10%), linfopenia (39%), alterações da função hepática (35%).

Efeitos colaterais graves: Distúrbios do Humor, depressão (tentativa de suicídio), poliartrite.

Eficácia a longo prazo: Estabilização no EDSS (Waubant E)

2-Acetato de Glatirâmer (Copaxone):

Mecanismo de ação:

Polímero sintético de aminoácidos baseado na estrutura da proteína básica da mielina (MBP), um dos autoantígenos implicados na patogênese da EM. Age pela estimulação da proteína básica da mielina (MBP); inibição da resposta das células T CD8+ contra MBP; indução de células T CD4+ do tipo Th2, produtoras de IL-10, que induzem imunossupressão, e conseqüente neuroproteção; supressão da inflamação por reação cruzada dos anticorpos contra MBP e aos antígenos do glatiramer além de regeneração dos elementos neurais no cérebro doente (Dhib-Jalbut S).

Dose: Adultos e crianças: 20 mg via SC/dia, diariamente.

Efeitos colaterais: Dor/enduração no local de aplicação, reação sistêmica transitória.

Eficácia a longo prazo: Estudo italiano – 7 pacientes – redução de recorrência de 2,5 a 0,1/ano e estabilização do EDSS (Ghezzi A).

Fluxograma de Tratamento das Doenças Desmielinizantes na Infância:

No SURTO de desmielinização de qualquer etiologia ou classificação nosológica (ADEM, CIS, EM, NO, MT, NMO):

Primeira linha: Metilprednisolona 30 mg/kg/dia ou 1g/dia se >30 Kg. 3 a 5 pulsos de 3 dias cada

Segunda linha: Imunoglobulina humana 2g/kg infundidos em 2 a 5 dias.

Terceira linha: Plasmaférese ou terapia de resgate com Ciclofosfamida

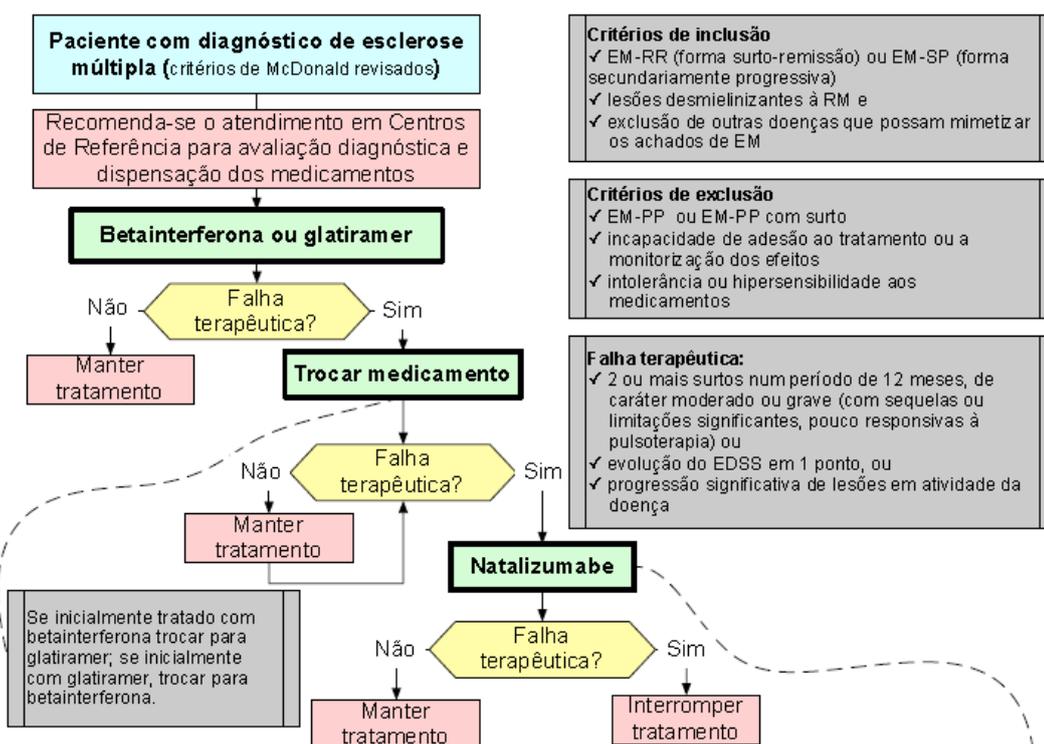
Tratamento entre surtos:

Neuromielite óptica: Mínima dose de corticoide oral, ou Acetato de Glatirâmer.
Esclerose Múltipla: vide fluxograma abaixo

Fluxograma para Tratamento de Esclerose Múltipla Forma Pediátrica

(excluir Natalizumabe)

fonte : ANVISA. Inclui termo de consentimento livre informado para Corticoterapia, interferon, Acetato de Glatirâmer, Azatioprina e Ciclofosfamida



Anexo 7: Artigo

Pediatric Multiple Sclerosis: The role of magnetic resonance imaging and chemokines profile in diagnosis and follow up

Alessandra Penna e Costa 1, Tania Saad 1, Lúcio Santa Ignez 1, Gabriel Gamarano 1, Ana Paula Lazzari 1 and Zilton Vasconcelos 1.
1. Fernandes Figueira Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

*Corresponding author. E-mail: zvasconcelos@iff.fiocruz.br (Z.V.)

Fundação	Oswaldo	Cruz	-	FIOCRUZ
Instituto Fernandes Figueira - IFF				
Departamento	de	Pesquisa		Clínica
Av. Rui Barbosa, 716 – Flamengo				
Cep: 22250-020	-	Rio	de	Janeiro/RJ
Brasil				

Abstract

Background: The role of magnetic resonance imaging (MRI) and cytokine profile during follow up of a pediatric multiple sclerosis (PMS) and its contribution to diagnosis and therapy. **Objective:** We report a pediatric patient who presented cytokine inflammation followed by MRI evolution compatible with PMS without significant neurological manifestations. **Methods:** MRI, Luminex-based 27 multiplex cytokine profile and clinical neurological examination performed during two and half years follow up. **Results:** Cytokine inflammation preceding a silent MRI demyelination event suggest no temporal coincidence between inflammation and CNS lesions. MRI anticipates PMS final diagnosis even without clear neurological manifestation. **Conclusion:** Inflammatory events might precede temporally CNS lesions when associated with MRI findings aggregating information about disease evolution in clinically stable and symptomless pediatric patients. Further studies are needed to establish new biomarkers with better temporal association and disease correlation.

Keywords: Pediatric multiple sclerosis, magnetic resonance imaging, cytokines.

Introduction

Pediatric multiple sclerosis (PMS) early diagnosis is a major challenge for neurology specialists, either by lack of knowledge or difficulty in differential diagnosis at this specific population. Recent studies estimated that only 5% of adult patients report neurological symptoms before second decade of life

(Fragoso et al., 2013). PMS patients tends to reach irreversible neurological sequel stage later in time but earlier at age when compared to adult MS patients. Early and precise diagnosis is key for specific treatment initiation and improve pediatric patients prognosis, once earlier neurological symptoms onset in PMS correlates positively with permanent sequelae risk. Guidelines for PMS diagnosis were recently reviewed and follow definitions published by International Pediatric MS Study Group. Neurological examination, Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS), specific laboratory tests and radiological imaging are considered. CNS lesions dissemination both in time and space observed by Magnetic Resonance Imaging (MRI) is pathognomonic for MS and critical for its evolutionary follow-up (Banwell et al., 2016). Clinically useful tools to anticipate PMS diagnosis, predict disease evolution and treatment response are urgently needed. Potential inflammatory related biomarkers are under extensive investigation but only oligoclonal band (OCB) in cerebrospinal fluid (CsF), seric and CsF anti-aquaporin-4 (Aqp4) and anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) are clinically useful. Until now, there is no consensus on serum or CsF inflammatory cytokines as biomarkers.

Case Report

ALAPL, 9-years-old, female, black, native of Rio de Janeiro, good neuropsychomotor development, on May, 2014, showed acute left hemiparesis. ALAPL denied visual changes, headache, vomiting, recent vaccination or fever. Brain MRI was performed showing hypointense oval images in T1 and T2 with fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) restricted diffusion signal with varied sizes in white matter at frontal lobes and periventricular pons, right thalamus, cerebellar peduncles and right cerebral peduncle. In addition, thalamus showed

tenuous contrast impregnation, compatible with demyelination. Subsequent spontaneous improvement with overall neurological regression was observed without drug therapy. Rheumatic and hematologic function tests were normal, IgM and IgG positive serology for Epstein Barr virus, CsF OCB positive and serum Aqp4 negative. Control MRI on September 2014 revealed no disease evolution without new contrast-enhancing CNS lesions and major lesions reduction (Figure 1A). In November 2014, neurological examination detected only a discrete dysmetria (EDSS=1), normal fundoscopy, normal spinal chord MRI, classified as clinically isolated syndrome (CIS). A regular follow up was started with a quarterly neurological examination and cytokine profile measurement with biannual MRI. ALAPL remained with unchanged neurological examination, EDSS and brain MRI (Figure 1B) with no image evolution. Nevertheless, serum cytokine evaluation performed in a period between those images (Figure 1F), detected the highest inflammatory relative index in inteleukin-8 (IL8), Macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1b), Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), Eotaxin and Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Subsequent cytokine dosage showed still higher index (Figure 1G and H) in comparison with initial dosage (Figure 1E). On May 2016, brain MRI detected hyperintense areas not exhibiting contrast enhancement, confirming CNS lesions disseminated in time and space, despite normal neurological examination and unchanged EDSS (Figure 1C). One month later, cytokine profile showed the lower index for all cytokines. Initial diagnosis was modified to PMS and subcutaneous interferon beta 1a (IFN-1a) therapy initiated in July 2016. Just after IFN-1a therapy, cytokine profile showed a specific IP-10 index peak. On March 2017, clinical evaluation showed unchanged neurological and EDSS results, good scholar performance

and recent menarche report. However, MRI at April 2017 showed novel CNS lesions with contrast enhancement in the right semi-oval center, characterizing subsequent demyelination event (Figure 1D). On May 2017, ALAPL was hospitalized and methylprednisolone treatment indicated.

Discussion

Herein we report an initially diagnosed CIS patient, with no subsequent neurological symptoms, that progressively presented changes in inflammatory cytokines preceding brain MRI compatible with PMS. Those findings demonstrate no temporal coincidence between the clinical, imaging and inflammatory evaluations. From 27 cytokines evaluated only IL8, MIP-1b, PDGF-BB, Eotaxin, MCP-1 and IP-10 showed significant variation during our analysis. The highest inflammatory peak was observed one year before radiological correlation, with a second smaller peak halfway before PMS conclusive MRI. The most prominent cytokine PDGF-BB is described as a potential proinflammatory biomarker, because it induces oligodendroglial progenitor cell growth and contributes to angiogenesis. However, Su et al were not able to correlate its increased levels and CNS lesions in adults with MS(Su et al., 2006). MIP-1b is associated with a possible immune response to interferon beta(Hegen et al., 2016), our result showed increase during the first cytokine storm and prior to immunomodulatory treatment. Only diminished levels of Eotaxin were previously reported by Tejera-Alhambra study where an association was found with recurrent remitting MS in adults(Tejera-Alhambra et al., 2015). Moreover, IP-10, a proinflammatory cytokine, was found to have a substantial increase after the onset of interferon beta therapy, as previously reported by Buttman et al in 2004(Buttmann, Merzyn, & Rieckmann, 2004).

According to Banwell et al, one-third of children with acquired demyelinating syndrome will be diagnosed as PMS within two to four years after first cortical demyelination. MS increased risk factors are first demyelination in adolescence, female and polyfocal deficits, while smaller children with ADEM have a lower risk (Banwell et al., 2016). ALAPL presented its first demyelination manifestation before adolescence, with focal clinical manifestations and spontaneous regression. However, due to the regular radiological follow-up, it was possible to follow subsequent lesions and establish early immunomodulatory treatment. MRI outpatient narrow follow-up should be implemented to anticipate PMS diagnosis and install early targeted therapies. Further studies are needed to establish new biomarkers with better temporal association between PMS and cytokine levels, MRI or neurological examination.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of the FIOCRUZ Technological Platform Network for Luminex dosages. This work was supported by IFF Research Grant Program – year 2015.

Author contributions

A.P.C. performed the patients follow up, analyzed the results and wrote the paper; T.S. design the research, supervised patient follow up and medical records; L.S.I. revised patient's radiologic images and medical records; G.G. performed the luminex experiments, analyzed the results and wrote the paper; A.P.L revised patient's radiologic images and medical records; Z.V. designed the research, supervised the experiments and their analysis and wrote the paper.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Banwell, B., Arnold, D. L., Tillema, J.-M., Rocca, M. A., Filippi, M., Weinstock-Guttman, B., ... Sormani, M. P. (2016). MRI in the evaluation of pediatric multiple sclerosis. *Neurology*, *87*(9 Supplement 2), S88–S96. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002787>
- Buttmann, M., Merzyn, C., & Rieckmann, P. (2004). Interferon- β induces transient systemic IP-10/CXCL10 chemokine release in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, *156*(1-2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.07.016>
- Fragoso, Y. D., Ferreira, M. L. B., Morales, N. de M. O., Arruda, W. O., Brooks, J. B. B., Carneiro, D. S. D., ... Silva, A. E. da. (2013). Multiple sclerosis starting before the age of 18 years: the Brazilian experience. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, *71*(10), 783–787. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130122>
- Hegen, H., Adrianto, I., Lessard, C. J., Millonig, A., Bertolotto, A., Comabella, M., ... Axtell, R. C. (2016). Cytokine profiles show heterogeneity of interferon-response in multiple sclerosis patients. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*, *3*(2), e202–e202. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000202>
- Su, J. J., Osoegawa, M., Matsuoka, T., Minohara, M., Tanaka, M., Ishizu, T., ... Kira, J. I. (2006). Upregulation of vascular growth factors in multiple sclerosis: Correlation with MRI findings. *Journal of the Neurological Sciences*, *243*(1-2), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2005.11.006>
- Tejera-Alhambra, M., Casrouge, A., De Andrés, C., Seyfferth, A., Ramos-Medina, R., Alonso, B., ... Sánchez-Ramón, S. (2015). Plasma biomarkers discriminate clinical forms of multiple sclerosis. *PLoS ONE*, *10*(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128952>

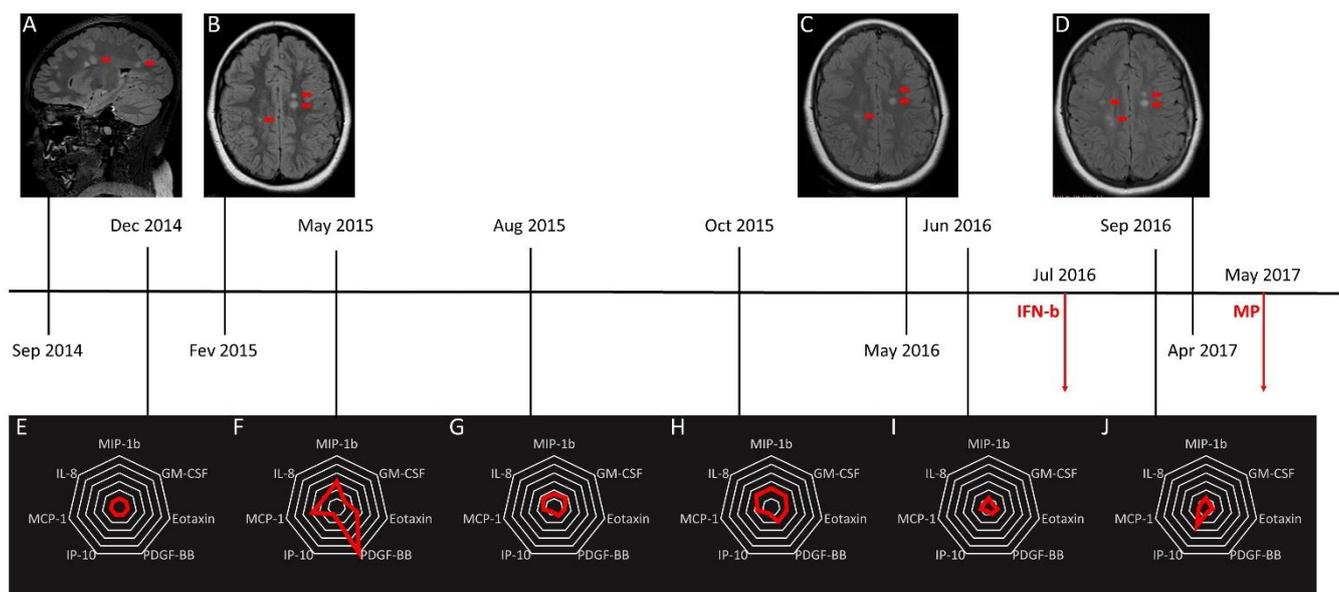


Figure 1: Timeline follow up with MRI and cytokine inflammatory profile: Whole-brain sagittal (A) and axial (B-D) sections showing CNS FLAIR lesions (red arrows); Cytokine profile (red line) in heptamerised spider charts with 6 concentric axis index normalized to first serum dosage (E) compared with subsequent measurements (F-J). Therapeutic intervention are shown in timeline transversal red arrows. EDSS (score=1) and neurological clinical assessment were performed in same cytokine profile moments and do not altered during this timeline evaluation.