



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE
MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DO MESTRADO INTEGRADO EM
MEDICINA**

MARIA CAROLINA MARTINS VIDAL

***MECANISMOS FARMACOLÓGICOS DA
TERAPÊUTICA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA***

ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

TRABALHO REALIZADO SOB ORIENTAÇÃO DE:

DRA. LÍVIA MARIA ABREU FREIRE DIOGO SOUSA

DR. JOÃO ANDRÉ SARGENTO ARAÚJO DE FREITAS

FEVEREIRO/2012



Mecanismos Farmacológicos da Terapêutica da Esclerose Múltipla

Maria Carolina Martins Vidal

Estudante do Curso de Mestrado Integrado em Medicina da

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Urbanização Quinta das Lágrimas, 2ª fase, lote 10, 3º A, 3040-375

caroll_vidal@hotmail.com

Trabalho realizado sob a orientação de:

Dra. Livia Maria Abreu Freire Diogo Sousa

Chefe do Serviço de Neurologia dos Hospitais da Universidade

de Coimbra e Assistente da Unidade Curricular de Neurologia da FMUC

Dr. João André Sargento Araújo de Freitas

Médico Interno de Neurologia e Assistente da Unidade

Curricular de Neurologia da FMUC

Índice de Conteúdos

1. Resumo.....	1
2. Palavras-Chave:.....	2
3. Abstract	3
4. Key words	4
5. Introdução.....	5
6. Material e Métodos.....	6
7. Resultados	10
8. Discussão.....	14
8.1 Enquadramento	14
8.2 Patogénese da EM.....	15
8.3 Fisiopatologia da EM.....	18
8.3.1 Apresentação de auto-antígenos	18
8.3.2 Proliferação e migração de linfócitos T auto-reativos até ao SNC.....	20
8.3.3 Inflamação no SNC	21
8.3.4 Remielinização intrínseca.....	24
8.3.5 Fases progressivas/neurodegenerativas	24
8.3.6 Padrões de desmielinização	25
8.3.7 Dano axonal	26

8.3.8	Implicações da fisiopatologia	27
8.4	Agentes terapêuticos	28
8.5	Abordagens terapêuticas existentes e potenciais	31
8.5.1	Neuroproteção	34
8.6	Mecanismos farmacológicos específicos.....	36
8.6.1	Interferões- β	36
8.6.2	Acetato de glatirâmero.....	40
8.6.3	Fingolimod.....	44
8.6.4	Natalizumab.....	48
8.6.5	Rituximab, Ocrelizumab e Ofatumumab.....	51
8.6.6	Daclizumab.....	55
8.6.7	Alemtuzumab.....	57
8.6.8	BG-12	60
8.6.9	Imunoglobulina G endovenosa.....	63
8.6.10	Cladribina	66
8.6.11	Laquinimod.....	68
8.6.12	Teriflunomida	71
8.6.13	Dalfampridina.....	74
9.	Conclusão	77

10. Agradecimentos.....	80
11. Referências bibliográficas.....	81

Índice de Figuras

Figura 1. Apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T4.	19
Figura 2. Alvos terapêuticos na Esclerose Múltipla.....	32
Figura 3. Mecanismo de Ação do IFN- β	38
Figura 4. Mecanismo de ação do Acetato de Glatirâmero	42
Figura 5. Mecanismo de ação do Fingolimod	47
Figura 6. Mecanismo de ação do Natalizumab.....	50
Figura 7. Mecanismo de ação do Rituximab	52
Figura 8. Mecanismo de ação do Daclizumab.....	56
Figura 9. Mecanismo de ação do Alemtuzumab	59
Figura 10. Mecanismo de ação do BG-12.	62
Figura 11. Mecanismo de ação da Imunoglobulina G endovenosa.....	65
Figura 12. Mecanismo de ação da Cladribina	67
Figura 13. Mecanismo de ação do Laquinimod.	70
Figura 14. Mecanismo de ação da Teriflunomida	73
Figura 15. Mecanismo de ação da Dalfampridina.....	76

Índice de Tabelas

Tabela I. Termos utilizados na pesquisa de Sinopses.....	7
Tabela II. Termos utilizados na pesquisa de Sínteses.	8
Tabela III. Termos utilizados na pesquisa de Artigos Originais.	9
Tabela IV. Resultados da pesquisa de Sinopses.....	10
Tabela V. Resultados da pesquisa de Sínteses	11
Tabela VI. Resultados da pesquisa de Artigos Originais.	12
Tabela VII. Fármacos aprovados no tratamento da EM.....	29
Tabela VIII. Fármacos emergentes no tratamento da EM.....	30
Tabela IX. Estratégias de neuroproteção.....	34
Tabela X. Estratégias de neuroproteção (cont.).....	35

Índice de Abreviaturas

ADCC	Citotoxicidade mediada por Células Dependente de Anticorpos
AG	Acetato de Glatirâmero
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i>
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barreira Hemato-Encefálica
CCR	<i>Chemokine Receptor</i>
Célula T_h	Células T <i>Helper</i>
Célula T_{reg}	Células T Reguladoras
Células NK	Células <i>Natural Killers</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DHODH	Enzima dihidroorotato desidrogenase
EAE	Encefalomielite Autoimune Experimental
EGCG	<i>Epigallocatechin-3-gallate</i>
EM	Esclerose Múltipla
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMPR	Esclerose Múltipla Progressiva Recidivante
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente Recidivante
EMSP	Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GrB	Granzima B
ICAM-1/2	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1/2</i>
IFN-γ	Interferão γ
IFN-β	Interferão β

IGIV	Imunoglobulina Intra-Venosa/Endovenosa
LCR	Líquido céfalo-raquídeo
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>
LMP	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
MHC	Complexo Major de Histocompatibilidade
MIP-1	<i>Macrophage Inflammatory Proteins 1</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinases</i>
NAB	Anticorpo neutralizante
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Óxido Nítrico
NPC	Células Progenitoras Neurais
Nrf2	<i>Nuclear-Related Factor erythroidderived 2</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted</i>
ROS	Espécies Reativas de oxigénio
S1P	Esfingosina 1-Fosfato
SCI	Síndrome Clínico Isolado
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases</i>
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor α</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4 Adhesion Molecule</i>

1. Resumo

Introdução: A Esclerose Múltipla é uma doença inflamatória, desmielinizante do Sistema Nervoso Central e constitui a principal causa de incapacidade não traumática no adulto jovem. No campo da terapêutica medicamentosa verifica-se, atualmente um grande investimento na criação de novos fármacos, particularmente com mecanismos de ação cada vez mais selectivos, dirigidos a alvos específicos da patogénese desta doença. Para além do aperfeiçoamento da farmacodinâmica, assiste-se ainda ao advento dos primeiros fármacos orais.

Objectivo: Este trabalho tem como objetivo a revisão sistemática da literatura científica disponível sobre os principais mecanismos farmacológicos da terapêutica da Esclerose Múltipla.

Desenvolvimento: Os principais fármacos utilizados no tratamento da Esclerose Múltipla podem ser classificados, grosso modo, em: imunomoduladores, imunossuppressores, modificadores da migração através da Barreira Hemato-Encefálica e neuroprotetores.

A modificação do Sistema Imunitário inclui a alteração do padrão de secreção de citocinas, estimulando a produção de citocinas anti-inflamatórias e inibindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como acontece durante o tratamento com os Interferões- β , Acetato de Glatirâmero, BG-12 ou Laquinimod. A imunomodulação pode incluir também, o sequestro de linfócitos nos órgãos linfoides pelo Fingolimod.

Anticorpos monoclonais como o Alemtuzumab, Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab e Daclizumab causam uma supressão do Sistema Imune, reduzindo a proliferação de linfócitos B e/ou T, através do bloqueio de glicoproteínas específicas na superfície destas células.

Alguns fármacos (e.g. Natalizumab) apresentam como principal mecanismo de ação a inibição da migração trans-endotelial de linfócitos auto-reativos através da Barreira Hemato-Encefálica. Esta inibição é devida ao bloqueio de moléculas de adesão indispensáveis ao processo de migração.

A neuroproteção, ainda que residual, pode ser promovida pela inibição da neurotoxicidade mediada por proteases citotóxicas produzidas pelos linfócitos T CD8⁺; pela otimização da remielinização através da diferenciação do precursor dos oligodendrócitos estimulada pelo Fingolimod, Interferões-β, BG-12 e ainda através da produção de factores neurotrópicos

Conclusão: O futuro do tratamento da Esclerose Múltipla parece promissor, no entanto progressivamente mais complexo. Atualmente com o aparecimento de anticorpos monoclonais e de fármacos como o Fingolimod atinge-se uma eficácia sem precedentes, todavia com efeitos secundários potencialmente graves, principalmente no que concerne à utilização de anticorpos monoclonais. Esta condição cria novos desafios ao neurologista e ao doente. Em contrapartida, o desenvolvimento de fármacos de administração oral, permitem um regime posológico bastante mais cómodo, aumentando a *compliance* terapêutica, facilitando o tratamento da Esclerose Múltipla.

2. Palavras-Chave:

Esclerose Múltipla; Terapêutica; Mecanismos de ação; Imunomodulação; Neuroproteção; Barreira Hemato-Encefálica.

3. Abstract

Introduction: Multiple Sclerosis is an inflammatory demyelinating disease affecting the central nervous system. It is also the leading cause of nontraumatic disability in young adults. There is currently a major investment in developing new drugs, concerning its treatment, with focus on those expressing a highly selective mechanism of action such as targeting specific agents on the disease's pathogenesis. Besides the improved pharmacodynamics, we also witness the arrival of the first oral agents.

Objective: The aim of this study is to present a systematic review on the available scientific literature concerning the main pharmacological mechanisms of drugs used in Multiple Sclerosis treatment.

Development: The main drugs used to treat Multiple Sclerosis can be classified in immunomodulators, immunosuppressants, blood-brain barrier migration modifiers and neuroprotective agents.

Immunomodulators can act by altering cytokine secretion pattern and/or through sequestration of lymphocytes in lymphoid organs. Fingolimod is the prototype of drugs presenting this last mechanism of action. The stimulation of anti-inflammatory cytokines production together with the inhibition proinflammatory cytokines secretion is on the basis of the first mechanism of action. β -interferons, Glatiramer Acetate, BG-12 and Laquinimod are some examples of drugs included in this group.

Monoclonal antibodies, such as Alemtuzumab, Rituximab, Ofatumumab, Ocrelizumab and Daclizumab cause immune system suppression. They reduce the proliferation of B and / or T lymphocytes, by blocking specific glycoproteins on the surface of these cells.

Other drugs (e.g. Natalizumab) inhibit trans-endothelial migration of autoreactive lymphocytes through the blood-brain barrier by blocking adhesion molecules essential for this process.

Neuroprotection, although residual, must be taken in consideration when regarding neurodegenerative diseases treatment. The inhibition of neurotoxicity induced by T CD8⁺ cytotoxic proteases, the optimization of the remyelination through oligodendrocytes differentiation and the production of neurotrophic factors are the main mechanisms by which neuprotectors act. Fingolimod, β -interferons, BG-12 can also be included in this class of pharmaceutical agents.

Conclusion: The future of Multiple Sclerosis treatment looks promising, but progressively more complex. With the advent of monoclonal antibodies and drugs such as Fingolimod we have achieved unprecedented effectiveness. However, this comes with potentially serious side effects, especially regarding to the use of monoclonal antibodies. This condition brings up new challenges to the neurologist and the patient. In contrast, the development of drugs for oral administration, allow a much more convenient dosing regimen, increasing therapeutic compliance, favouring the treatment of Multiple Sclerosis.

4. Key words

Multiple Sclerosis; Therapeutics; Mechanisms of action; Immunomodulation; Neuroprotection; Blood-brain barrier.

5. Introdução

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune, inflamatória e desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC). Em Portugal, estima-se que a EM afete 50 pessoas em cada 100.000, ou seja, aproximadamente 5000 portugueses. (Sá, 2010)

Ainda não se conhece totalmente a fisiopatologia da EM, permanecendo este um assunto controverso. De facto, a maioria dos estudos sugerem o conceito de EM como doença inflamatória primária. Contudo nas fases progressivas a EM apresenta reminiscências de uma doença neurodegenerativa com um declínio funcional contínuo com pouca atividade inflamatória. (Stadelmann, 2011)

Relativamente ao tratamento, o objetivo de qualquer terapia modificadora do curso da EM é reduzir a frequência e gravidade dos surtos e prevenir ou atrasar a evolução para uma fase progressiva da doença. (Horga e Tintoré, 2011)

À data não existe cura para a EM, contudo nas últimas duas décadas várias terapias têm sido desenvolvidas. A lista de fármacos aprovados, atualmente, inclui três formulações do Interferão- β (IFN- β), Acetato de Glatirâmero, Mitoxantrona, Natalizumab e Fingolimod. De acordo com os protocolos recomendados pela *Food and Drug Administration* (FDA) o IFN- β , Acetato de Glatirâmero e Fingolimod são terapêuticas de primeira linha na EM Recidivante-Remitente. A Agência Europeia do Medicamento (EMA) considera o Fingolimod um fármaco de segunda linha. A Mitoxantrona e o Natalizumab também são considerados fármacos de segunda linha reservados geralmente para doentes que não respondem à terapia de primeira linha ou que não toleram os efeitos secundários da mesma. (Portaccio, 2011)

6. Material e Métodos

Foi efetuada uma pesquisa de artigos organizada segundo o sistema de Haynes, ou sistema dos 5 "S" um modelo que permite organizar fontes de informação médica baseada na evidência. Segundo este sistema conceptual a organização das fontes de informação é feita em cinco patamares de uma pirâmide. Este modelo é útil na pesquisa da evidência no ambiente clínico, tendo sido concebido para encontrar informação, de forma eficiente, num curto espaço de tempo.

No topo da pirâmide encontram-se os *Systems* que são *Decision Support Services*, que correspondem a sistemas computadorizados que ligam características individuais dos doentes de forma a obter o máximo de evidência científica pertinente. Infelizmente estes ainda se encontram em fase de desenvolvimento.

No patamar abaixo desta pirâmide encontram-se os *Summaries*, são guias da prática clínica que integram as melhores evidências provenientes das camadas inferiores, fornecendo um vasto espectro de evidência científica sobre um determinado tópico.

No terceiro nível deste sistema organizativo encontram-se as *Synopses* (descrições sucintas de estudos individuais ou de uma revisão sistemática). O penúltimo patamar da pirâmide de Haynes é composto pelas *Syntheses* que são sínteses da evidência (e.g. revisões sistemáticas).

Na base da pirâmide encontram-se os *Studies* (artigos originais) que correspondem à maior fatia da produção científica.

No patamar *Summaries* procedeu-se à pesquisa de artigos na base *Dynamed* e *Up To Date* com o termo "*Multiple Sclerosis*". No patamar *Synopses*, foi acedida a base de dados *Evidence Based Medicine* e *ACP (American College of Physicians) Journal Club*. A pesquisa é esquematizada na Tabela I.

Tabela I. Termos utilizados na pesquisa de Sinopses.

Sinopses	
Bases de dados: <i>Evidence Based Medicine</i> e <i>ACP Journal Club</i>	
<p>“Multiple Sclerosis”</p> <p>AND</p>	<p>“Beta interferon”</p> <p>“Acetate glatiramer”</p> <p>“Natalizumab”</p> <p>“Fingolimod”</p> <p>“BG-12” OR “Dimethyl Fumarate”</p> <p>“Rituximab”</p> <p>“Ocrelizumab”</p> <p>“Ofatumumab”</p> <p>“Alemtuzumab”</p> <p>“Daclizumab”</p> <p>“Teriflunomide”</p> <p>“Laquinimod”</p> <p>“Intravenous imunoglobulin” OR “Intravenous imunoglobulins” OR “ivig”</p> <p>“Cladribine”</p> <p>“Dalfampridine”</p>

No grupo das Sínteses foram acedidas as bases de dados *Cochrane Library* e *Pubmed*. Para a pesquisa de Sínteses na *Pubmed* foi aplicado o filtro metodológico “*Clinical Queries*”, o qual permite a obtenção de revisões sistemáticas, meta-análises, consensos, guidelines e artigos de Medicina Baseada na Evidência. A pesquisa está esquematizada na Tabela II.

Tabela II. Termos utilizados na pesquisa de Sínteses.

Sínteses	
Bases de dados: <i>Cochrane Library</i> e <i>Pubmed</i>	
“Multiple Sclerosis” AND	“Beta interferon”
	“Acetate glatiramer”
	“Natalizumab”
	“Fingolimod”
	“BG-12” OR “Dimethyl Fumarate”
	“Rituximab”
	“Ocrelizumab”
	“Ofatumumab”
	“Alemtuzumab”
	“Daclizumab”
	“Teriflunomide”
	“Laquinimod”
	“Intravenous imunoglobulin” OR “Intravenous imunoglobulins” OR “ivig”
	“Cladribine”
	“Dalfampridine”

A pesquisa de artigos originais - *Studies* - foi executada na base *Pubmed*, aplicando a ferramenta *MESH: Medical Subject Heading*, para a linguagem médica controlada. Introduziu-se o tópico “*Multiple Sclerosis*” e aplicou-se o qualificador *Drug Therapy*. A pesquisa foi limitada entre 2007-2012, na língua inglesa, portuguesa e espanhola. Exceptuando a pesquisa para Imunoglobulina G endovenosa, pois devido à dificuldade na

obtenção de artigos recentes sobre o seu mecanismo de ação foi necessário alargar a pesquisa retirando o filtro temporal. O filtro major: [majr] foi aplicado para seleccionar artigos que apresentam como tema principal a terapêutica da EM, excluindo artigos que apenas mencionam este tópico como um tema menor/secundário. Na tabela III apresenta-se o esquema da pesquisa.

Tabela III. Termos utilizados na pesquisa de Artigos Originais.

<i>Studies - Artigos Originais</i>	
Bases de dados: <i>Pubmed</i>	
"Multiple Sclerosis/ Drug Therapy"[majr] AND	"Beta interferon"
	"Acetate glatiramer"
	"Natalizumab"
	"Fingolimod"
	"BG-12" OR "Dimethyl Fumarate"
	"Rituximab"
	"Ocrelizumab"
	"Ofatumumab"
	"Alemtuzumab"
	"Daclizumab"
	"Teriflunomide"
	"Laquinimod"
	"Intravenous imunoglobulin" OR
	"Intravenous imunoglobulins" OR "ivig"
"Cladribine"	
"Dalfampridine"	

7. Resultados

No patamar *Summaries* a pesquisa de artigos na base *Dynamed* com o termo “*Multiple Sclerosis*” obteve 1 resultado. Na base *Up To Date* a mesma pesquisa não obteve resultados. Para a pesquisa de *Synopses*, foi acedida a base de dados *ACP Journal Club* e *Evidence Based Medicine*. Os resultados da pesquisa estão esquematizados na Tabela IV.

Tabela IV. Resultados da pesquisa de Sinopses.

	Sinopses	<i>ACP Journal Club</i>	<i>Evidence Based Medicine</i>
“Multiple Sclerosis” AND	“Beta interferon”	0	167
	“Acetate glatiramer”	3	42
	“Natalizumab”	4	21
	“Fingolimod”	3	18
	“BG-12” OR “Dimethyl Fumarate”	0 0	18 18
	“Rituximab”	1	19
	“Ocrelizumab”	0	18
	“Ofatumumab”	0	18
	“Alemtuzumab”	0	18
	“Daclizumab”	0	18
	“Teriflunomide”	0	18
	“Laquinimod”	0	18
	“Intravenous imunoglobulin” OR “Intravenous imunoglobulins” OR “ivig”	0	0
	“Cladribine”	3	18
	“Dalfampridine”	0	18

No grupo das Sínteses foram acedidas as bases *Cochrane Library* e *Pubmed*. A pesquisa é sistematizada na Tabela V.

Tabela V. Resultados da pesquisa de Sínteses

	Sínteses	<i>Cochrane Library</i>	<i>Pubmed - filtro "Clinical Queries"</i>
"Multiple Sclerosis" AND	"Beta interferon"	1	126
	"Acetate glatiramer"	5	40
	"Natalizumab"	1	31
	"Fingolimod"	1	11
	"BG-12" OR "Dimethyl Fumarate"	0	0
		0	0
	"Rituximab"	1	0
	"Ocrelizumab"	0	0
	"Ofatumumab"	0	1
	"Alemtuzumab"	0	3
	"Daclizumab"	1	2
	"Teriflunomide"	0	0
	"Laquinimod"	0	1
	"Intravenous imunoglobulin" OR "Intravenous imunoglobulins" OR "ivig"	2	21
	"Cladribine"	0	9
"Dalfampridine"	0	2	

A pesquisa de Artigos Originais na base *Pubmed* obteve os resultados expostos na Tabela VI.

Tabela VI. Resultados da pesquisa de Artigos Originais.

<i>Studies - Artigos Originais</i>		<i>Pubmed</i>		
“Multiple Sclerosis/ Drug Therapy”[majr] AND	“Beta interferon”	395		
	“Acetate glatiramer”	276		
	“Natalizumab”	283		
	“Fingolimod”	102		
	“BG-12” OR “Dimethyl Fumarate”	14		
	“Rituximab”	83		
	“Ocrelizumab”	5		
	“Ofatumumab”	3		
	“Alemtuzumab”	50		
	“Daclizumab”	38		
	“Teriflunomide”	21		
	“Laquinimod”	31		
	“Intravenous imunoglobulin” OR “Intravenous imunoglobulins” OR “ivig”	2007-2012	Sem limites	
		40*	208*	
	“Cladribine”	55		
“Dalfampridine”	16			
Total com repetições		1412		
Repetições		501		
Total sem repetições		911		

* Obtiveram-se 40 resultados para a pesquisa da Imunoglobulina endovenosa com limites entre 2007-2012. Devido à escassez de artigos sobre os seus mecanismos de ação a pesquisa foi alargada sem limites temporais obtendo-se 208 artigos originais. Não foram contabilizados no total de artigos.

Concluiu-se que do total dos 1412 artigos, 501 repetem-se nas diferentes pesquisas, obtendo-se um real valor de 911 artigos originais.

De entre todos os resultados obtidos foram seleccionados 65 artigos consoante o factor de impacto da revista, autores e pertinência dos seus conteúdos.

8. Discussão

8.1 Enquadramento

A EM uma doença autoimune, inflamatória e desmielinizante do SNC, que afeta aproximadamente 2,3 milhões de pessoas a nível mundial (Sobiera, 2011).

A EM corresponde a uma das principais causas de incapacidade neurológica crónica, não traumática, em adultos jovens. Afeta tipicamente pessoas no auge da sua vida produtiva, com um pico de incidência entre os 20-40 anos, causando enorme impacto social, familiar e económico. (Portaccio, 2011) A perda precoce de produtividade e o elevado custo do tratamento multidisciplinar são responsáveis pelo elevado impacto socioeconómico desta doença. (Horga e Tintoré, 2011)

Embora apresente preferência por certas áreas cerebrais, a EM pode comprometer qualquer área do SNC, o que condiciona enorme multiplicidade de manifestações: disestesias, parestesias, alterações da marcha, nevrite óptica retro-bulbar, diplopia, ataxia, vertigem, depressão, alterações cognitivas, entre outras.

Na realidade, a EM apresenta uma enorme heterogeneidade fenotípica, variando desde apresentações clínicas indolentes em que os doentes podem permanecer vários anos sem limitação funcional, até formas rapidamente incapacitantes, com redução da esperança de vida. (Rainer *et al.*, 2010) Sem tratamento, aproximadamente 50% dos doentes com EM apresentam incapacidade para a marcha autónoma 15 anos após a doença. (Strader *et al.*, 2011)

A evolução clínica da EM é variável e pode ser classificada em quatro padrões: EM Recidivante-Remitente (EMRR), Primária Progressiva, Secundária Progressiva e Progressiva Recidivante. (Sobiera, 2011)

Na maioria dos casos (80-90%) a doença apresenta, no seu início, um carácter Recidivante-Remitente (ou de Exacerbação Remissão), em que as exacerbações da EM (surtos) são seguidas de um período de recuperação total ou parcial (geralmente parcial), os períodos entre a doença caracterizam-se por uma ausência de progressão. Há tendência a um acumular da incapacidade ao longo do tempo. (Portaccio, 2011) Em 30-40% dos casos de EMRR, a doença adquire um carácter progressivo, passando a designar-se Secundária Progressiva, fase em que a incapacidade se acumula progressivamente apesar da ausência de exacerbações. (Strader *et al.*, 2011)

Numa proporção mais pequena (10-20% dos casos) a doença inicia-se de uma forma Primária Progressiva, que se distingue por uma progressão contínua da doença desde o início, sem surtos, com fases de estabilização ocasionais e com possíveis melhorias ligeiras temporárias. (Sobiera, 2011)

Quando a doença é progressiva desde o início mas com recidivas evidentes, com ou sem recuperação completa e os períodos entre as recidivas apresentam uma progressão contínua designa-se EM Progressiva Recidivante. (Sobiera, 2011)

8.2 Patogénese da EM

A patogénese da EM ainda se encontra em grande parte desconhecida. Contudo a etiologia multifatorial é a mais proposta. Recentes estudos epidemiológicos centram a atenção em factores genéticos, ambientais e ainda na controversa teoria da insuficiência venosa cerebroespinal. (Ontaneda *et al.*, 2011)

A componente genética da EM é sugerida pela concordância de 5% entre gémeos dizigóticos e de 20-30% entre gémeos monozigóticos. Esta susceptibilidade associa-se ao complexo

Major de Histocompatibilidade (MHC) no cromossoma 6, mais especificamente ao alelo *DRB1*1501*. (Alcina *et al.*, 2012)

Entre os factores de susceptibilidade ambiental destacam-se o factor geográfico, o défice de vitamina D e uma reduzida exposição solar e ainda a infeção pelo vírus Epstein-Barr.

Há muito que é conhecida uma maior incidência de EM nos países mais afastados do Equador. Independentemente de qual o factor ambiental em causa nas latitudes mais elevadas, este terá de exercer o seu efeito numa fase precoce da vida, pois os estudos epidemiológicos mostram que os indivíduos que viveram até aos 15 anos em zonas de baixo risco e que depois se mudam para zonas de alto risco, não sofrem um aumento de risco para a EM. (Disanto *et al.*, 2011)

O défice de vitamina D é apontado como um factor de risco para EM. Em modelos experimentais animais verificou-se que a suplementação com vitamina D pode mesmo prevenir o aparecimento da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) o modelo experimental da EM. (Ontaneda *et al.*, 2011) Vários estudos mostraram uma correlação inversa entre os níveis de 25-hidroxivitamina D e a incidência, gravidade e progressão da EM. Acredita-se que a vitamina D pode inibir a maturação das células dendríticas, a função das células B e favorecer a imunidade T_h2. (Wootla *et al.*, 2011)

Assim os baixos níveis de vitamina D, resultantes de uma reduzida exposição solar, podem explicar a maior incidência de EM nos povos que vivem a elevadas latitudes. A teoria do défice de vitamina D poderá inclusive justificar, para alguns, a discordância entre gémeos monozigóticos, devido a diferentes exposições solares durante a infância. (Disanto *et al.*, 2011)

Várias infeções virais (e bacterianas: Chlamydia pneumonia) foram apontadas como factores de risco para a EM, contudo ainda não existem dados conclusivos. Entre vírus como Herpes Simplex, Varicela Zoster, Herpes Humano-6, implicados recentemente na patogénese da EM, destaca-se o vírus Epstein-Barr. (Wootla *et al.*, 2011)

De facto, estudos de meta-análise recentes mostram uma incidência de EM dez vezes superior nos indivíduos com infeção precoce pelo vírus Epstein-Barr quando comparados com doentes seronegativos. (Ontaneda *et al.*, 2011)

A hipótese de insuficiência venosa cerebroespinal crónica como factor patogénico na EM é polémica. De facto, Zamboni *et al.* verificaram que os doentes com EM apresentam múltiplas e graves estenoses no sistema venoso cerebroespinal. Estes investigadores sugerem que a estenose do sistema venoso extracraniano causaria um défice de drenagem com refluxo venoso no sistema intra e extra-craniano, com perda da autoregulação do fluxo (Zamboni *et al.*, 2009) e uma reacção imune secundária à acumulação de ferro no SNC. (Awad *et al.*, 2011)

Esta hipótese tem recebido mais atenção e alguns sugerem a neuro-intervenção vascular como estratégia terapêutica. A controvérsia mantém-se porque os resultados apresentados por Zamboni não foram reprodutíveis em nenhuma das múltiplas investigações subsequentes. Permanece incerto se a insuficiência venosa cerebroespinal crónica existe como uma entidade patológica ou uma variante anatómica nos doentes com EM. (Awad *et al.*, 2011)

8.3 Fisiopatologia da EM

Ainda não se conhece totalmente a fisiopatologia da EM. Os estudos patológicos, imagiológicos, serológicos e genéticos sustentam o conceito da EM como uma doença inflamatória primária. Contudo nas fases progressivas a EM apresenta reminiscências de uma doença neurodegenerativa com um declínio funcional contínuo com pouca atividade inflamatória. Apesar da discussão, vários estudos mostram que a atividade inflamatória da doença se correlaciona diretamente com a perda neuronal. (Stadelmann, 2011)

8.3.1 Apresentação de auto-antígenos

A cascata patológica da EM inicia-se quando no compartimento periférico os linfócitos T CD4⁺ reconhecem um auto-antígeno específico de um componente da mielina (ainda desconhecido) que lhes é apresentado pelas moléculas do MHC-II presente na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC). Podem funcionar como APC's os macrófagos, células dendríticas, células da micróglia e linfócitos B. (Kala *et al.*, 2011)

São fundamentais para a apresentação antígenos e consequente ativação das células T, as seguintes ligações:

- Ligação MHC-II da APC ao CD4 do linfócito T4/*Helper* (T_h), para apresentação do antígeno.
- Ligação entre o VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) da APC ao VLA-4 (*Very Late Antigen 4 adhesion molecule*) do linfócito T_h.
- Ligação entre o ICAM-1/2 (*Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*, também conhecido como CD54) da APC ao LFA-1 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*) do linfócito T_h.
- Ligação entre o LFA-3 da APC ao CD2 do linfócito T_h.

- Ligação entre o B7-1 (molécula co-estimuladora) da APC ao CD28 e ao CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) do linfócito T_h, traduz um sinal co-estimulador, ativando o linfócito T. Na ausência deste sinal, as células T permanecem inativadas, em anergia, incapazes de responder a um antígeno mesmo que este seja apresentado uma segunda vez com os sinais co-estimuladores. (Rainer *et al.*, 2010)

Estas ligações estão ilustradas na Fig. 1.

Apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T

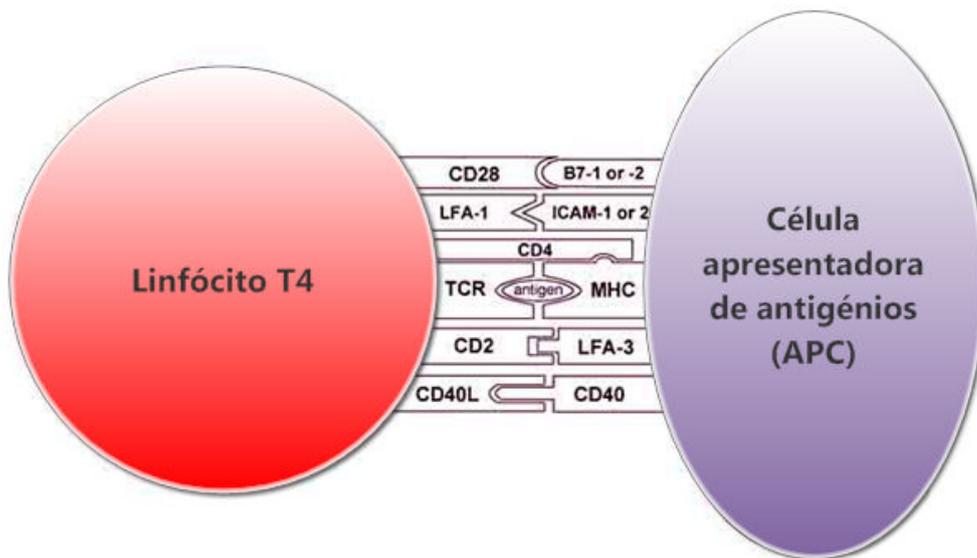


Figura 1. Apresentação de antígenos e ativação de linfócitos T4.

Fonte: Adaptado de Kirkwood *et al.*, 2008.

8.3.2 Proliferação e migração de linfócitos T auto-reativos até ao SNC

Os linfócitos T auto-reativos proliferam nos tecidos linfoides e depois, por quimiotaxia, migram até ao SNC. Para atingir o parênquima do SNC, os linfócitos devem penetrar através da Barreira Hemato-Encefálica (BHE), através de um processo de migração transendotelial. A migração trans-BHE é mediada por uma complexa interação entre moléculas de adesão (como as selectinas e integrinas), metaloproteinases da matriz e ainda citocinas que causam uma disrupção da BHE. (Horga e Tintoré, 2011)

Este processo de migração através da BHE divide-se em cinco fases, uma fase inicial de captura e *rolling* do linfócito ao longo das células endoteliais que constituem a face externa da BHE. Para este processo é essencial a ligação do VLA-4 linfocitário através do recetor da integrina $\alpha 4\beta 1$ ao VCAM-1 endotelial. Segue-se o fenómeno de ativação, com a libertação de citocinas e eicosanóides que precede a fase de adesão firme que contempla a ligação VLA-4-VCAM-1 e a ligação LFA-1-ICAM-1. Depois destas ligações, o linfócito “rasteja” ao longo das células endoteliais até iniciar a última etapa: a diapedese, levada a cabo pelas complexas interações já referidas e a produção de metaloproteinases da matriz, permitindo que o leucócito migre através do endotélio, membrana basal, chegando ao parênquima do SNC. (Engelhardt, 2008)

8.3.3 Inflamação no SNC

a. Linfócitos T

Os linfócitos T desempenham um papel central na fisiopatologia da EM. Ambos os tipos celulares: CD4⁺ e CD8⁺ são identificados nas lesões de EM, as células CD4⁺ predominam nas lesões agudas, enquanto que as CD8⁺ predominam nas lesões crônicas. (Kala *et al.*, 2011)

No SNC, os linfócitos T CD4⁺ ativados iniciam a formação de lesões inflamatórias agudas, através da produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-17. (Rainer *et al.*, 2010)

Os linfócitos T CD4⁺ auto-reativos que produzem grande quantidade de IL-17 (atualmente designados de células T_h17) inibem a ação reguladora das células Treguladoras (T_{reg}). A diminuição da função destas células T_{reg} CD4⁺ e CD25⁺ (promotoras da imunotolerância) encontra-se implicada na fisiopatologia da EM, dado que o seu défice deixa o SNC vulnerável aos exageros das células T auto-reativas. (Rainer *et al.*, 2010)

Com o evoluir do processo de inflamação, a disseminação de epítomos desencadeia o recrutamento de outras células inflamatórias - fenómeno designado *bystander activation*. Acredita-se que múltiplos clones de linfócitos T CD8⁺ se acumulem nas lesões de EM, bem como no LCR. Atribui-se a estas células uma capacidade de amplificação do processo inflamatório iniciado pelas células TCD4⁺. Estes linfócitos T CD8⁺ danificam diretamente os neurónios e oligodendrócitos, através da libertação de produtos citotóxicos dos seus grânulos. (Haile *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010)

b. Linfócitos B

Os linfócitos B apresentam um papel que se pressupõe cada vez mais relevante na patogénese da EM, tanto na inflamação aguda como crónica. (Kala *et al.*, 2011) Para além de terem uma função importante como APCs, condicionam outros mecanismos de autoimunidade na EM. (Rainer *et al.*, 2010)

Na fase de inflamação aguda, depois de uma etapa de apresentação e ativação, as células B sofrem expansão clonal, maturam em células memórias e plasmócitos que libertam grandes quantidades de imunoglobulina γ (anticorpos IgG) produzidas à periferia ou mesmo no interior do SNC. Estes anticorpos vão ligar-se ao respectivo epítipo (componente da mielina), ativar o Sistema do Complemento causando inflamação. (Rainer *et al.*, 2010)

Estudos recentes sugerem que o nível de produção intra-tecal de imunoglobulina poderá ser um melhor factor predictor da progressão da doença que a própria Ressonância Magnética. Assim a identificação precoce de bandas oligoclonais na eletroforese do LCR poderá correlacionar-se com um pior prognóstico da doença, salientando a importância da imunidade humoral na fisiopatologia da EM. (Wootla *et al.*, 2011)

De facto, as células B assumem um papel importante na promoção da neuroinflamação crónica, dado que estimulam a proliferação de células T e a diferenciação T_H17 . (Monson *et al.*, 2011) Para além deste facto, concluiu-se que nos doentes com EM as células B apresentam uma produção deficiente de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. (Wootla *et al.*, 2011)

Em contrapartida Wootla *et al.* (2011) identificaram um papel benéfico das células B na EM. Os anticorpos IgM sHIgM22 e sHIgM46 demonstraram capacidade de remielinização e os anticorpos sHIgM12 e sHIgM42 capacidades neuroprotetoras. A sHIgM22 liga-se aos

oligodendrócitos e à mielina promovendo a remielinização nos modelos de EM induzidos por vírus e toxinas. Para além disto, este anticorpo inibe fortemente a apoptose através da redução das caspases 3 e 9. Estes anticorpos também são responsáveis pela limpeza de restos de mielina dos locais de inflamação aguda, importante na promoção da remielinização.

Deste modo estes autores defendem que as células B podem desempenhar um papel deletério (agravamento da desmielinização) ou benéfico (remielinização) consoante o microambiente. Assim seria importante identificar os doentes que respondem à depleção das células B (por predominarem os seus efeitos deletérios) ou que respondem a terapias promotoras da remielinização com anticorpos. (Wootla *et al.*, 2011)

c. Astrócitos

Recentemente tem-se atribuído um papel importante dos astrócitos na patogénese da EM. De facto, os astrócitos podem contribuir de diferentes formas no processo patogénico. Através da secreção de metaloproteinases da matriz e falência da BHE, através da expressão de moléculas de adesão e produção de citocinas facilitando a entrada de células inflamatórias. Os astrócitos podem ainda secretar TNF- α e linfotoxina- α causando morte dos oligodendrócitos e lesão axonal direta. (Cohen e Chun, 2011)

Os astrócitos estão também envolvidos na formação de tecido cicatricial de astrogliose e gliose que caracterizam as lesões crónicas de EM e que podem interferir com o processo de remielinização ou regeneração axonal. (Cohen e Chun, 2011)

8.3.4 Remielinização intrínseca

Depois de um insulto inflamatório, ocorre naturalmente uma tentativa de reparação do dano axonal. Este processo inclui a migração de células progenitoras neurais (NPC) até à lesão. Nesta as NPC podem diferenciar-se em todas as linhas celulares, incluindo oligodendrócitos. Assim as NPC diferenciam-se em oligodendrócitos pré-mielinizantes recobrando os axónios desmielinizados, contribuindo para o fenómeno de remielinização e reparação das lesões de EM. (Fox, 2010). Este processo de remielinização pode ser bastante completo em algumas lesões, especialmente nas fases precoces da EM, permitindo a restauração da função. (Ontaneda *et al.*, 2010)

Recentemente surgiram evidências de que este fenómeno de neuro-restauração é inibido pela atividade da Granzima B (GrB) produzida pelos linfócitos T CD8⁺, mostrando que a neuro-inflamação pode comprometer a neuro-restauração. (Espejo e Montalban, 2012; Wang *et al.*, 2010)

8.3.5 Fases progressivas/neurodegenerativas

Contudo, a capacidade de neurorestauração intrínseca do SNC acaba eventualmente por ser esgotada pelos ataques inflamatórios sucessivos. Assim, ao longo da história natural da doença este mecanismo restaurador vai perdendo a eficácia e vão-se acumulando os défices neurológicos, em virtude da desmielinização progressiva não controlada. (Ontaneda *et al.*, 2011)

8.3.6 Padrões de desmielinização

Lucchinetti *et al.* (2000) sugerem quatro padrões de desmielinização. Esta variabilidade fisiopatológica mantém-se em congruência com a grande heterogeneidade do curso clínico da EM.

Segundo aqueles autores, o padrão I, surge em 15% dos casos. Aqui a desmielinização é mediada por macrófagos e por linfócitos T (ativados por macrófagos e células da micróglia). Em 58% dos casos (padrão II), a inflamação é mediada por células e por anticorpos (objetivável pelas bandas oligoclonais) com posterior ativação do sistema complemento, dirigido contra componentes básicos da mielina. (Lucchinetti, 2000)

Nestes dois subtipos, o mecanismo patológico subjacente é claramente autoimune. Contudo nos subtipos III e IV as lesões são altamente sugestivas de uma distrofia primária do oligodendrócito, induzida por vírus ou toxinas, ao invés de um mecanismo autoimune. (Lucchinetti, 2000)

Assim, no padrão III (26% dos casos) a inflamação conduzida por células T e macrófagos associa-se a uma degenerescência distal do oligodendrócito (que se assemelha à lesão induzida por hipóxia). Esta degenerescência pode culminar em apoptose ou condicionar uma remielinização insuficiente. Menos frequentemente (1% dos casos) a desmielinização tem origem numa lesão primária do oligodendrócito, de possível origem genética. Associando-se uma desmielinização secundária dependente de macrófagos. (Lucchinetti, 2000)

8.3.7 Dano axonal

Apesar de não se conhecerem os exatos mecanismos que condicionam o dano axonal, durante os últimos anos tem se tornado cada vez mais evidente que a disfunção axonal ocorre precocemente no curso da doença. (Stadelmann, 2011)

O aparecimento de esferoides nas lesões agudas pode ser um indicador de secção neuronal resultando numa degeneração anterógrada ou retrógrada. Este não é um fenómeno raro na EM, o que prova a precocidade do dano axonal. Acredita-se que esta lesão axonal precoce é devida à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e óxido nítrico (NO). (Herges *et al.*, 2011; Stadelmann, 2011)

O dano axonal pode ser causado por mecanismos imunológicos mediados pelas células TCD8⁺ e os produtos citotóxicos contidos nos seus grânulos como a serina-protease Granzima B (Haile *et al.*, 2011); pela ativação de células da glia e macrófagos no parênquima; por defeitos na homeostasia do cálcio e mecanismos excitotóxicos. (Ontaneda *et al.*, 2011) Para além disto, identificaram-se depósitos lineares de complemento ativado (C3d) em axónios parcialmente desmielinizados localizados peri-placa, sugerindo um papel do sistema do Complemento no dano axonal. (Wootla *et al.*, 2011)

O dano axonal pode ser também causado pelo efeito indireto da desmielinização prolongada, resultando numa redistribuição dos canais de sódio ou ausência de enzimas do oligodendrócito. Pensa-se que os canais de sódio persistentemente ativados e o subsequente fluxo de sódio excessivo altere as trocas sódio/cálcio, causando uma sobrecarga axonal de cálcio que pode ser tóxica. (Ontaneda *et al.*, 2011)

Outros estudos sugerem que o dano inflamatório das mitocôndrias constitui um factor relevante no dano axonal, tanto nas lesões agudas como crónicas da EM. Mais

especificamente a redução da atividade do complexo Citocromo C oxidase da cadeia respiratória mitocondrial poderá estar envolvida no dano axonal na EM. (Stadelmann, 2011)

Alterações citoesqueléticas no compartimento neuronal, axonal e glial podem refletir uma alteração do equilíbrio das cinases e fosfatases, alterações que poderão ser corrigidas através de terapêutica neuroprotetora dirigida. Para além disto os mediadores inflamatórios podem iniciar a disrupção axonal através da translocação da HDAC1 (desacetilase das histonas 1) do núcleo para o citosol. (Stadelmann, 2011)

8.3.8 Implicações da fisiopatologia

Estes conhecimentos fisiopatológicos influenciam as estratégias terapêuticas a seguir. Assim a terapêutica imunológica será provavelmente mais eficaz nas fases inflamatórias da doença (EMRR e Progressiva Recidivante). Enquanto que nas fases progressivas a terapêutica imunológica dificilmente mudará o curso neurodegenerativo da doença. (Barten *et al.*, 2010)

Sendo assim torna-se necessário apostar numa terapêutica que contemple a neuroproteção/neuroregeneração. Tais objetivos podem ser alcançados através de fármacos que aumentem a plasticidade neuronal e a reconstrução do axónio, através da remielinização e ainda através do fornecimento de ambiente óptimo em termos de factores de crescimento. (Ontaneda *et al.*, 2011)

8.4 Agentes terapêuticos

O objetivo de qualquer terapia modificadora de doença na EM é reduzir a frequência e gravidade dos surtos, e respectivas sequelas traduzidas por aumento da incapacidade e prevenir ou atrasar a evolução para uma fase progressiva da doença. (Horga e Tintoré, 2011)

À data não existe cura para a EM, contudo nas últimas duas décadas várias terapias têm sido desenvolvidas. A lista de fármacos aprovados, atualmente, inclui três formulações do Interferão- β (IFN- β), Acetato de Glatirâmero, Mitoxantrona, Natalizumab e Fingolimod. De acordo com as recomendações da FDA o IFN- β , Acetato de Glatirâmero e Fingolimod são terapêuticas de primeira linha na EMRR. A salientar, a EMA considera o Fingolimod um fármaco de segunda linha, ao contrário da FDA. A Mitoxantrona e o Natalizumab são considerados fármacos de segunda linha, por ambas as agências reguladoras, reservados para formas muito agressivas ou para doentes que não respondem à terapia de primeira linha ou que não toleram os efeitos secundários da mesma. (Portaccio, 2011)

As evidências de eficácia da terapêutica imunomoduladora ou imunossupressora nas fases progressivas da doença são bastante mais limitadas e apenas a Mitoxantrona e o IFN- β 1b foram aprovados para a EM secundária progressiva. (Portaccio, 2011)

Embora as terapêuticas de primeira linha tenham demonstrado ser eficazes na redução das taxas de recidiva e na diminuição da velocidade de progressão da doença estas são administradas por via parentérica. Na realidade, uma das barreiras à adesão terapêutica é a ansiedade e desconforto induzidos pela injeção. Adicionalmente, a formação de anticorpos neutralizantes associados à terapêutica com IFN- β pode estar associada a uma redução da sua eficácia a longo prazo. (Fox, 2010; Sobiera, 2011) Deste modo a emergência de uma nova geração de fármacos de administração oral na EM pode mudar o paradigma de tratamento

desta doença. Nesta nova geração incluem-se fármacos como o Fingolimod, Teriflunomida, Laquinimod, BG-12 e Finategrast. (Limmroth *et al.*, 2011)

Na tabela VII faz-se uma sistematização dos fármacos já aprovados no tratamento da EM e na tabela VIII são referidas abordagens terapêuticas emergentes.

Tabela VII. Fármacos aprovados no tratamento da EM

Fármaco	Indicações	Via	Mecanismo de ação
IFN- β1b (Betaferon[®], Extavia[®])	1 ^a linha na EMRR EMSP, SCI	Subcutânea	Imunomodulador
IFN- β1a (Avonex[®])	1 ^a linha na EMRR e SCI	Intramuscular	Imunomodulador
IFN- β1a (Rebif[®])	1 ^a linha na EMRR	Subcutânea	Imunomodulador
Acetato de Glatirâmero (Copaxone[®])	1 ^a linha na EMRR e SCI	Subcutânea	Imunomodulador e Neuroprotetor
Mitoxantrona (Novantrone[®])	EMSP, EMPR, 2 ^a linha na EMRR	Intravenosa	Supressão de células B e T, inibição de MMP
Natalizumab (Tysabri[®])	2 ^a linha na EMRR	Intravenosa	Inibidor da migração dos leucócitos ativados através da BHE
Fingolimod (Gilenya[®])	1 ^a linha(FDA)/ 2 ^a linha (EMA) na EMRR	Oral	Sequestrador de linfócitos à periferia e neuroprotetor

EMRR: Esclerose Múltipla Recidivante-Remitente; EMSP: Esclerose Múltipla Secundária Progressiva; SCI: Síndrome Cínico Isolado; EMPR: Esclerose Múltipla Progressiva Recidivante; BHE: Barreira Hematoencefálica. FDA: *Food and Drug Administration*, EMA: Agência Europeia do Medicamento.

Tabela VIII. Fármacos emergentes no tratamento da EM

Fármaco	Mecanismo de ação	Efeitos
Rituximab/ Ocrelizumab/ Ofatumumab	Anticorpo monoclonal quimérico/humanizado/humano anti-CD20	Depleção de células B Diminuição da atividade T, por diminuição da apresentação pelas células B
Alemtuzumab	Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD52	Depleção de células CD52: B, T, macrófagos, monócitos, células dendríticas e granulócitos Estabilização da BHE
Daclizumab	Anticorpo monoclonal humanizado anti-CD25 (Recetor da IL-2)	Redução da sobrevivência de células T. Expansão das células NK CD56 ⁺ , com depleção de células T ativadas
BG-12	Anti-oxidante, anti- inflamatório, neuroprotetor	Balanco positivo T _h 2. Redução da secreção de IL-2, TNF- α Neuroproteção dependente do Nrf2
Cladribina	Análogo dos nucleosídeos (citostático imunossupressor)	Depleção de células T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e B
Teriflunomida	Antagonista das pirimidinas (citostático imunossupressor)	Supressão de células B e T Balanco positivo T _h 2. Redução da secreção de IFN- γ . Supressão de células B e T
Laquinimod	Anti-inflamatório e Neuroprotetor	Balanco positivo T _h 2 e T _h 3 Aumenta a produção de TGF- β Apoptose de células TCD8 ⁺ e B

Nrf2: *Nuclear-related factor erythroid-derived 2* ; TNF- α : *Tumoral Necrosis Factor α* ;
IFN- γ : *Interferon γ* ; TGF- β : *Transforming Growth Factor β* .

No tratamento da EM, também se recorre a fármacos imunossupressores como a Azatioprina, Micofenolato de Mofetil e Ciclofosfamida contudo estes fármacos citotóxicos podem causar uma imunossupressão excessiva, deixando o doente vulnerável a infeções e neoplasias, para além do risco de nefro e cardiotoxicidade. Em virtude dos efeitos secundários destes fármacos e principalmente da falta de evidência demonstrada em estudos randomizados duplamente cegos contra placebo, como é o caso do Micofenolato de Mofetil, estes são apenas utilizados como terapêutica de recurso “*off label*” em formas graves de EM. Nos últimos anos, têm-se estudado outros imunossupressores com melhor perfil de segurança como o Laquinimod e a Teriflunomida. (Rainer *et al.*, 2010)

É de salientar que a Imunoglobulina Endovenosa (IGIV) também é usada no tratamento da EM. Mais propriamente nos surtos. De facto, a IGIV reduz a taxa de surtos e aumenta o intervalo de tempo livre de surtos, contudo não existem evidências de que esta terapêutica possa atrasar a progressão da EM. (Gray *et al.*, 2010)

8.5 Abordagens terapêuticas existentes e potenciais

Depois de identificadas as principais etapas que integram a fisiopatologia da EM podemos conjecturar novos mecanismos farmacodinâmicos e reconhecer outros mecanismos que já são postos em prática na terapêutica atualmente disponível. Estes principais mecanismos surgem esquematizados na Fig.2.

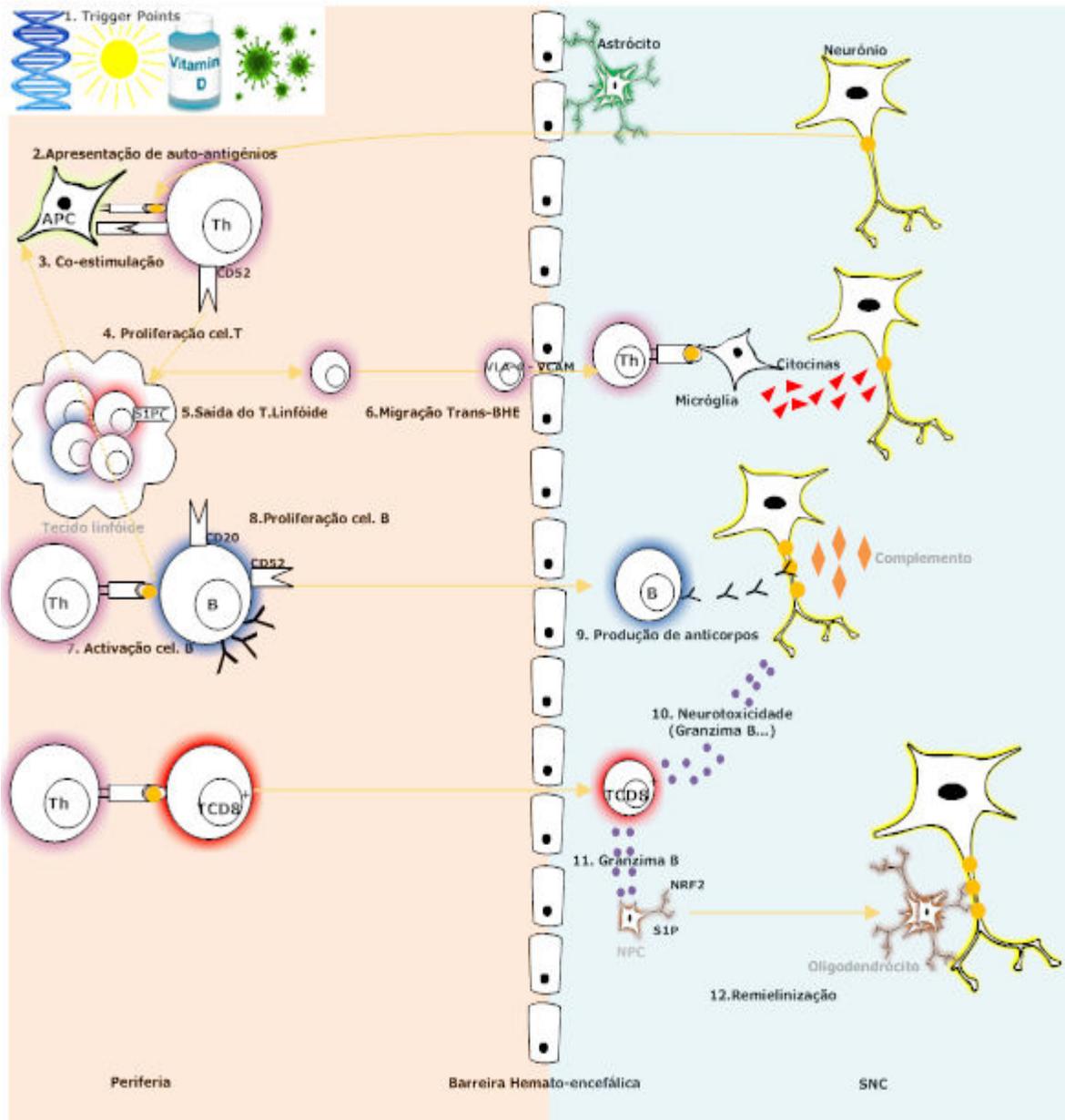


Figura 2. Alvos terapêuticos na Esclerose Múltipla

1. *Trigger points*: Terapia génica? Suplementação com Vitamina D?
2. Inibição da apresentação de auto-antígenos.
3. Inibição da co-estimulação através do bloqueio da ligação LFA-3 (Teriflunomida) da APC ao CD28 do linfócito T_h e ligação entre o B7-1 da APC ao CD28 e CTLA-4 do linfócito T_h.
4. O bloqueio CD52 inibe a proliferação de células B e T (Alemtuzumab).
5. Sequestro de linfócitos nos órgãos linfóides pelo agonismo S1P (Fingolimod).

6. Inibição da migração trans-endotelial da BHE, através do bloqueio VLA-4 (Natalizumab e Fingolimod).

7. 8. 9. Inibição da ativação, proliferação, apresentação antigénica e produção de autoanticorpos pelas células B, através do bloqueio CD52 (Alemtuzumab) e CD20 (Rituximab). Neutralização de autoanticorpos (IGIV).

10. Inibição na neurotoxicidade mediada pela Granzima B e outras proteases citotóxicas produzidas pelos linfócitos T CD8⁺ (manose-6-fosfato?)

11. Reduzir o efeito inibidor da Granzima B na neuroregeneração (bloqueio dos canais Kv1.3)

12. Otimização da remielinização através da diferenciação do precursor dos oligodendrócitos em oligodendrócitos estimulada pelo Fingolimod (agonismo S1P), IFN- β , BG12 (via Nrf2), entre outros.

Fonte: Elaboração própria

8.5.1 Neuroproteção

Em todas as formas progressivas da EM predomina a neurodegeneração ao invés da inflamação, deste modo as estratégias mais eficazes nestas fases passarão pela neuroproteção. Na realidade, alguns dos fármacos já aprovados alcançam alguns níveis de neuroproteção secundária, o que é espectável uma vez que a redução da inflamação reduz também a degeneração neuronal. Contudo esta eficácia marginal não é suficiente para travar as formas progressivas, deste modo o desenho de novos fármacos deverá apostar numa estratégia de neuroproteção primária. (Ontaneda *et al.*, 2010)

Várias abordagens terapêuticas unicamente neuroprotetoras têm sido estudadas contudo nenhuma atingiu o nível de aplicabilidade clínica. (Stadelmann, 2011) Na tabela IX e X apresentam-se algumas das estratégias neuroprotetoras em estudo.

Tabela IX. Estratégias de neuroproteção

Estratégias neuroprotetoras	Mecanismo
Laquinimod	Produção de factores neurotróficos como BDNF
BG-12	Neuroproteção dependente do factor Nrf2
Dalfampiridina	Bloqueio dos canais Kv1.3 inibe a neurotoxicidade exercida pela GrB
Lamotrigina, Fenitoína, Flecainida	Bloqueio dos canais de sódio
Transplante de células estaminais hematopoiéticas	<i>Reset</i> Imunológico
Eritropoetina	Ação anti-apoptótica, anti-oxidante. Estimula a angiogénese e neurogénese. (Ontaneda <i>et al.</i> , 2011)

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*; Kv1.3: canais de Potássio dependentes de voltagem tipo 1.3; Grb: Granzima B.

Tabela X. Estratégias de neuroproteção (cont.)

Estratégias neuroprotetoras	Mecanismo
Antagonistas dos Canabinóides ^a	Inibição da apoptose (redução da expressão da calpaina 1) reduz a degeneração axonal (Hasseldam e Johansen, 2011)
Estatinas (Sinvastatina)	Inibe diferenciação de células T _h 17. Reduz a secreção de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 de células T CD4 ⁺ naíve (Zangh <i>et al.</i> , 2011)
Estriol	Proteção neuronal contra excitotoxicidade e stress oxidativo e proteção de oligodendrócitos mediada por ER- α e β (Gold e Voskuhl, 2009)
Testosterona	Diferenciação neuronal; proteção neuronal contra stress oxidativo; Produção de factores neurotróficos como o BDNF (Gold e Voskuhl, 2009)
Ibudilast	Inibidor das fosfodiesterases com ação anti-inflamatória (inibe a síntese de leucotrienos, NO e TNF- α). (Barkhof <i>et al.</i> , 2010)
Imunoglobulinas neuroprotetoras: sHIgM22, sHIgM46, sHIgM12 e sHIgM42 ^b	Remielinização. Inibição da apoptose através da redução das caspases 3 e 9. Limpeza de restos de mielina. (Wootla <i>et al.</i> , 2011)
Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) (Herges <i>et al.</i> , 2011)	Efeito neuroprotetor sinérgico com o AG. Inibe a apoptose TRAIL e glutamato dependente
Fingolimod	Para além da imunomodulação, estimula a diferenciação de oligodendrócitos

^aFitocannabinóides como o canbidiol diminuem o dano axonal e inflamatório, bem como a ativação da micróglia e recrutamento de células T; ER- α e β : *Nuclear Estrogen Receptor*; BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*; NO: Óxido nítrico; TNF- α : *Tumoral necrosis Factor α* ; AG: Acetato de Glatirâmero

8.6 Mecanismos farmacológicos específicos

8.6.1 Interferões- β

Os Interferões- β (IFNs- β) são fármacos de primeira linha no tratamento da EM. As três formulações de IFN- β : IFN- β 1b subcutâneo (Betaferon[®] e Extavia[®]), IFN- β 1a intramuscular (Avonex[®]) e IFN- β 1a subcutâneo (Rebif[®]) mostraram reduzir a taxa de surtos, o número de lesões na Ressonância Magnética e ainda a atrofia cerebral. Tratam-se de compostos imunomoduladores, contudo o espectro total das suas ações não se encontra completamente esclarecido. (Mendes e Sá, 2011)

Os anos 90 foram dominados pela publicação de vastos ensaios clínicos com IFN- β , inicialmente utilizado na EM pela sua atividade antiviral. Atualmente sabe-se que a sua principal ação é imunomoduladora. (Mendes e Sá, 2011)

O IFN- β é utilizado devido à capacidade de inibir a ação biológica do IFN- γ e assim reduzir a atividade inflamatória neuronal. Contudo sabe-se que é responsável por uma miríade de mecanismos adicionais, incluindo a inibição da ativação de células T, modulação da produção de citocinas, e ainda redução da migração de células T. Assim o IFN- β pode ser considerado uma citocina anti-inflamatória que também é capaz de ativar alguns componentes da resposta inflamatória. (Mendes e Sá, 2011)

Deste modo o vasto leque de mecanismos de ação do IFN- β inclui:

- Inibição da co-estimulação e /ou ativação dos linfócitos T:
 - Inibição da expressão de moléculas MHC-II induzidas pelo IFN- γ e de outras moléculas necessárias à ativação da célula T.
 - Modulação de moléculas coestimuladoras nas células dendríticas.
 - Redução do precursor de células T reativas à mielina.

- Redução do número de APCs. (Mendes e Sá, 2011)
- Redução da atividade de células NK.
- Modulação de citocinas anti e pró-inflamatórias:
 - Aumento da produção de IL-10 (inibe a produção de citocinas) e IL-4 (estimula a produção de células B e modula a resposta imunitária).
 - Diminuição da produção de IL-12 (estimula a produção de células imunocompetentes).
 - Diminuição da produção de TNF- α e IFN- γ .
 - Supressão de células T_H1. (Vinod e Plese,2011)
- Diminuição da migração de células T aberrantes e estabilização da BHE:
 - Potenciação da eliminação de VCAM-1 do endotélio com transformação em composto solúvel.
 - Redução da expressão de genes das integrinas.
 - Inibição da expressão do mRNA da MIP-1 α (*Macrophage Inflammatory Proteins*), RANTES (*Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*) e CCR-5 (*Chemokine Receptor*).
 - Aumento dos níveis de TIMP-1 (*Tissue Inhibitors of MMP*).
 - Redução da secreção de TNF- α e IL-1.
 - Redução da secreção de MMP (*Matrix Metalloproteinases*) estimulada pela IL-2.
 - Redução da migração de células T guiada para o RANTES e MIP-2.
 - Redução dos níveis de MMP-9. (Mendes e Sá, 2011)
- Neuroproteção

Evidências recentes sugerem que o IFN- β 1b poderá atuar diretamente nas NPC (células progenitoras/estaminais neurais) no Sistema Nervoso Central. As NPC podem diferenciar-se em todas as linhas celulares, contribuindo para o fenómeno de remielinização e reparação das

lesões de EM. (Fox, 2010) Estudos com utilização de NPC humanas *in vitro* mostraram que a maioria destas células (>98%) apresenta recetores para o IFN α e β . O IFN- β 1b é capaz de induzir a proliferação de NPCs, estimulando o mecanismo de auto-regeneração neuronal. (Fox, 2010). Estes mecanismos de ação são sumariados e esquematizados na Fig.3.

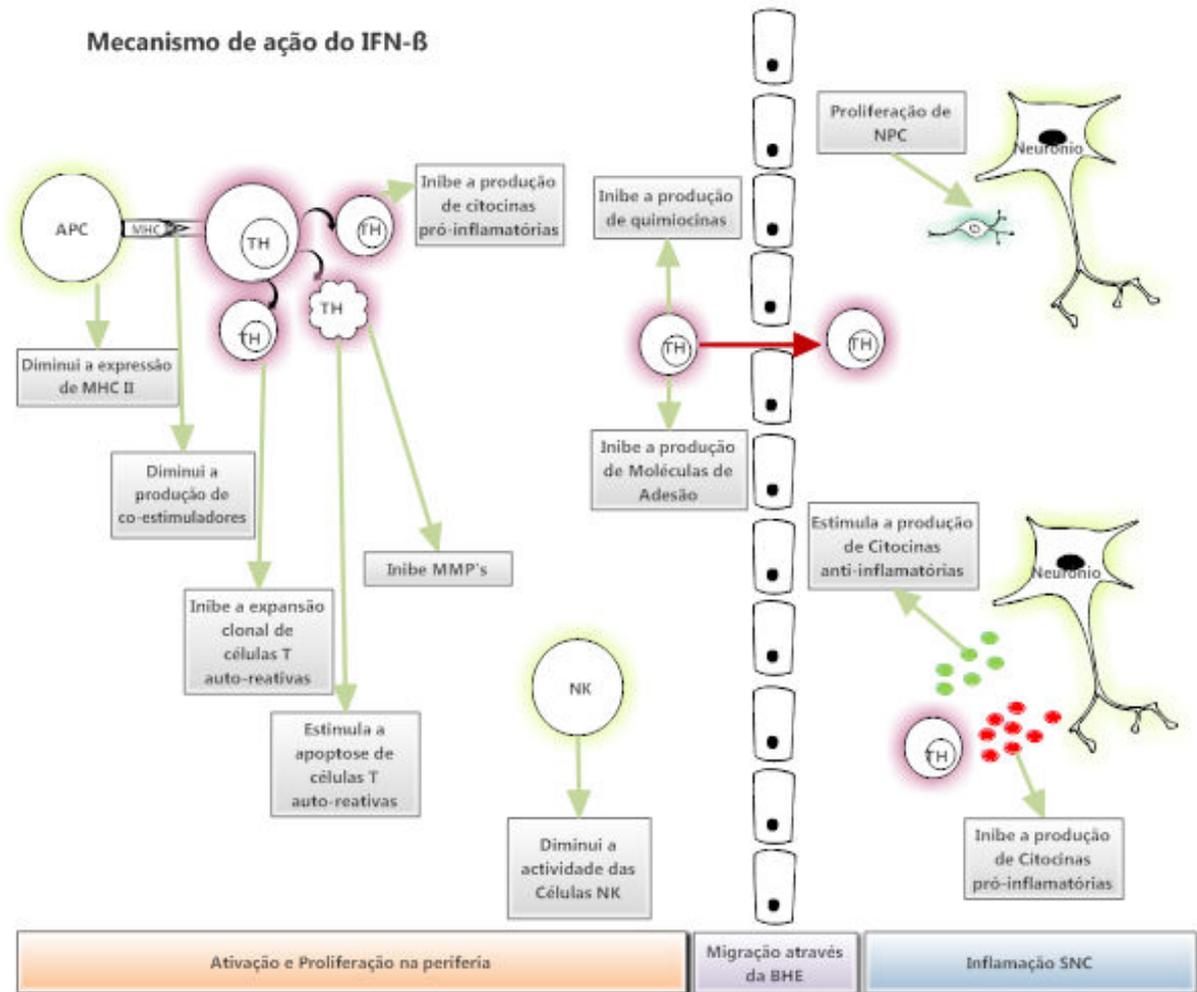


Figura 3. Mecanismo de Ação do IFN- β

O IFN- β tem uma ação imunomoduladora: aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias e reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias; Diminui a expressão de MHC-II, pelas APCs; Diminui os níveis de co-estimuladores; Inibe a proliferação de células T auto-reativas e promove a sua apoptose; Diminui a atividade das células NK e inibe a produção de moléculas de adesão e de Metaloproteínas da Matriz. Em termos de neuroproteção o IFN- β poderá induzir a proliferação de NPC - células progenitoras do oligodendrócito.

Fonte: Elaboração própria.

As três formulações de IFN- β são genericamente bem toleradas e o aperfeiçoamento da técnica de injeção, controlo de efeitos secundários e a educação do doente contribuem para um aumento da *compliance* terapêutica. (Limmroth *et al.*, 2011)

A antigenicidade é variável entre as três formulações. O IFN- β 1b subcutâneo apresenta a maior antigenicidade, seguido do IFN- β 1a subcutâneo e o IFN- β 1b intramuscular com a menor capacidade antigénica. Esta variabilidade é devida à técnica de produção, excipientes, método de administração, pH e agregação *in vivo* do produto. (Limmroth *et al.*, 2011)

Os efeitos adversos mais comuns são as reações no local da injeção com as formulações subcutâneas IFN- β 1a e IFN- β 1b (89% e 78% respectivamente). Estas reações são raras com a formulação intramuscular. Outro efeito secundário comum é a síndrome gripal, controlável com anti-inflamatórios não-esteroides ou paracetamol. (Limmroth *et al.*, 2011),

O desenvolvimento de anticorpos neutralizantes (NABs) é uma das complicações associadas à utilização de IFN- β , muito embora atualmente o significado clínico dos NABs permaneça controverso. Contudo, evidências crescentes sugerem um decréscimo da atividade do IFN- β , com redução da eficácia terapêutica. A via de administração intramuscular é a menos imunogénica, logo a menos associada à formação de NABs. (Voort *et al.*, 2010)

Estudos recentes mostraram que os doentes que desenvolvem NABs que persistem após a cessação terapêutica apresentam uma taxa anualizada de surtos aumentada e maior progressão da incapacidade. Para além disso a formação de NABs está associada à adoção de estratégias terapêuticas mais agressivas, como a Mitoxantrona, com prejuízo para o doente. De outro prisma, a tendência para desenvolver NABs depois da descontinuação pode ser o reflexo de um sistema Imunitário mais ativo, previamente associado a um curso clínico mais agressivo da EM, independentemente da terapêutica. (Voort *et al.*, 2010)

8.6.2 Acetato de glatirâmero

O Acetato de Glatirâmero (Copaxone[®], conhecido anteriormente como Copolímero 1) está disponível como terapia de primeira linha na EMRR desde 1996. Desde então a noção do seu valor terapêutico tem evoluído. (Johnson, 2010)

O Acetato de Glatirâmero (AG) é um membro da família de compostos glatiramóides, composto por uma mistura de polipéptidos sintéticos derivados de 4 aminoácidos (L-tirosina, L-glutamato, L-alanina e L-lisina) que foram originalmente desenhados para criar um análogo da proteína básica da mielina. (Boster *et al.*, 2011)

O AG foi desenhado com o objetivo de criar um encefaloantígeno que despoletasse a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), o modelo animal da EM. Surpreendentemente o AG não causou EAE, pelo contrário mostrou prevenir o desenvolvimento desta. (Kala *et al.*, 2011)

Na realidade, o AG é um fármaco imunomodulador com capacidades neuroprotetoras. Sabe-se que durante o tratamento com AG ocorre um aumento dos níveis de citocinas com atividade anti-inflamatória como IL-4, IL-10 e TGF- β e uma redução dos níveis de TNF- α (com atividade pró-inflamatória). (Racke e Lovett-Racke, 2011)

Pensa-se que o AG atue como um ligando peptídeo alterado, modificando a resposta das células T patogénicas. (Racke e Lovett-Racke, 2011) O AG liga-se às moléculas MHC-II na superfície das APC's, competindo com a mielina por estes recetores, inibindo a ativação e proliferação de células T reativas à mielina. O AG é então processado pela APC e apresentado às células CD4⁺ e CD8⁺. A apresentação por APC's modificadas resulta na produção de células CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg}, que promovem a imunotolerância. (Herges *et al.*, 2011)

Para além disso o AG corrige o défice de células $CD8^+ T_{reg}$ que se observa na EM, restaurando-o para níveis idênticos aos de indivíduos saudáveis. Assim o AG estimula a atividade supressora das células $CD8^+$ que podem destruir diretamente as células $CD4^+$ auto-reativas. (Boster *et al.*, 2011)

Acredita-se que o AG induz a produção das células T_{reg} à periferia, estas atravessam a BHE e reconhecem a mielina como ligando péptido alterado, respondendo com a secreção de citocinas T_h2 e T_h3 , que inibem as células T_h1 , efetivando assim a designada “*bystander suppression*”. (Boster *et al.*, 2011) Causando assim um desvio que favorece a imunidade T_h2 . Deste modo, pode dizer-se que o AG atua como um imunomodulador que restaura os normais circuitos regulatórios da imunidade que estão pervertidos na EM. (Kala *et al.*, 2011)

O AG induz, ainda, a produção do antagonista do recetor da IL-1 (sIL-1Ra), um inibidor natural da IL-1 β nos monócitos. Pensa-se que o sIL-1Ra atravesse a BHE e possa mediar atividades anti-inflamatórias, antagonizando os efeitos da IL-1 β . (Carpintero *et al.*, 2010)

Os plasmócitos reativos ao AG secretam imunoglobulinas, preferencialmente do isotipo IgG4, que, hipoteticamente, poderão entrar no SNC e mediar algum tipo de efeito imunomodulador. (Weber *et al.*, 2007)

As células NK também sofrem alterações durante o tratamento com o AG, estas mostram uma capacidade superior de eliminação de células dendríticas. Apesar disto o AG não provoca alterações nas contagens de NK ou na expressão de CD69. (Kala *et al.*, 2011)

Para além do mecanismo imunomodulador, alguns estudos sugerem um efeito de neuroproteção, neurogénese e remielinização do AG. Acredita-se que as células T_h2 reativas ao AG produzam, nos locais de inflamação, factores neurotróficos como o BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) e neurotrofinas 3 e 4. (Herges *et al.*, 2011) O BDNF é um

importante factor de diferenciação e sobrevivência de neurónios. Vários estudos mostram que o BDNF pode recuperar neurónios em degeneração, estimulando o crescimento axonal e remielinização dos mesmos. (Kala *et al.*, 2011)

Deste modo, o AG poderá apresentar um efeito neuroprotetor para além de um já consagrado efeito imunomodulador. O mecanismo de ação do AG é ilustrado na Fig.4.

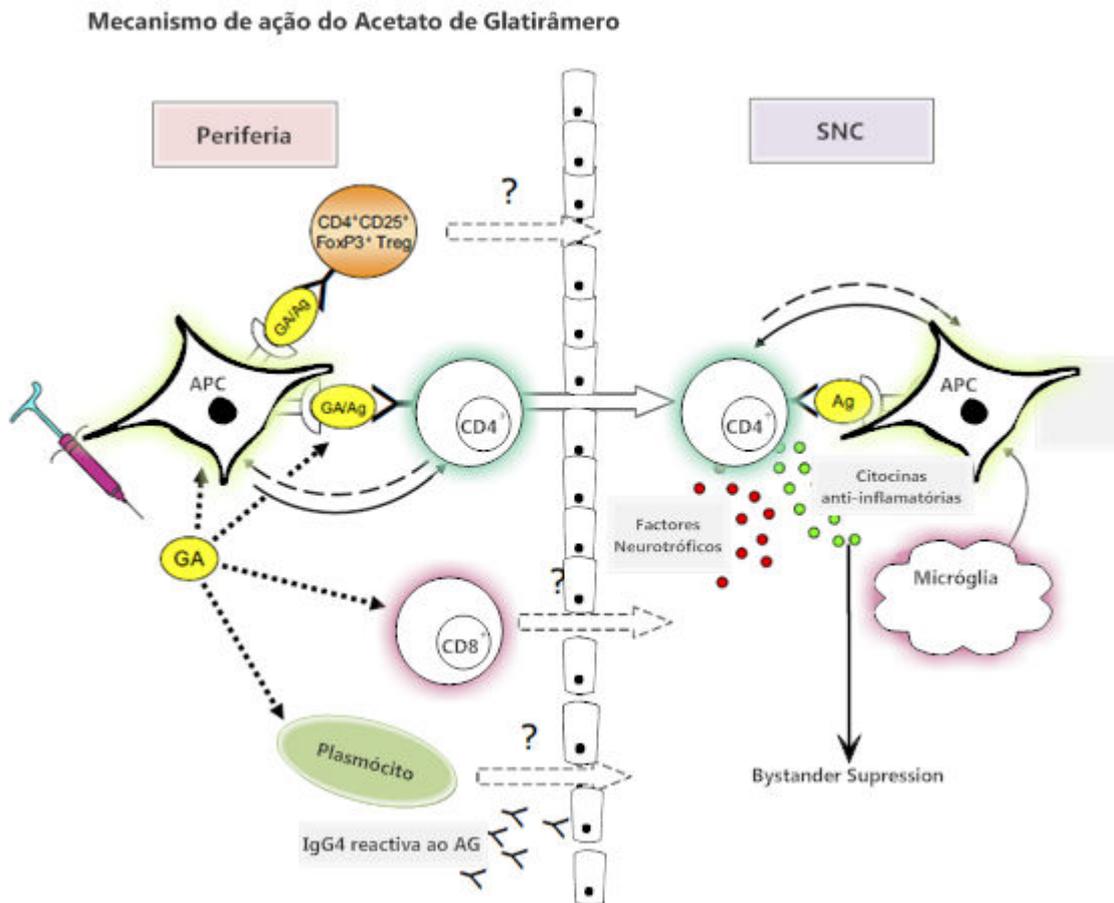


Figura 4. Mecanismo de ação do Acetato de Glatirâmero

O Acetato de Glatirâmero através da apresentação por APCs modificadas causa a produção de células $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ T_{reg}$ que promovem a imunotolerância. As células $T_{h2} CD4^+$ reativas ao AG atravessam a BHE e no SNC reconhecem a mielina, secretando citocinas anti-inflamatórias e factores neurotróficos, reduzindo a inflamação local, efectuando a designada *bystander suppression*. As citocinas produzidas por estas células $T_{h2} CD4^+$ promovem a diferenciação de células APC tipo II. O AG induz a produção de células $CD8^+ T_{reg}$ supressoras da autoimunidade. Os plasmócitos reativos ao AG secretam anticorpos que poderão atravessar a BHE e promover efeitos imunomoduladores.

Fonte: Adaptado de Weber *et al.*, 2007.

Em termos de segurança, os efeitos secundários mais comuns são as reações no local de injeção (prurido e eritema) que podem afetar 80% dos doentes em tratamento com o AG. Cerca de 10-15% dos doentes sofrem uma Reação Isolada Pós-Injeção caracterizada por dor torácica, dispneia, taquicardia, ansiedade e *flushing*. Apesar de assustadoras estas reações não se associam (até à data) a nenhuma complicação cardiovascular ou sistémica. É importante referir que entre todas as terapêuticas aprovadas no tratamento da EM, só o AG recebe a classificação B para a gravidez, enquanto todos os outros recebem classificação C. (Boster *et al*, 2011)

O AG representa um candidato ideal para terapias combinadas, por exemplo, com o IFN- β ou com o Natalizumab (estudo GLANCE). (Boster *et al*, 2011) Um outro estudo levado a cabo por Herges *et al*. (2011) mostrou que a combinação AG com o *Epigallocatechin-3-gallate* (EGCG), o principal fenol do chá verde proporcionou um efeito neuroprotetor sinérgico *in vitro* e na EAE. Este efeito foi alcançado através da proteção contra morte neuronal induzida pelo glutamato e TRAIL (*Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand*) secretado pelas células T e micróglia. Para além disto a associação AG e EGCG promove o crescimento axonal *in vitro*. Estes fármacos mostraram atrasar o início da EAE e reduzir a gravidade da doença, de forma sinérgica. Acredita-se que as capacidades neuroprotetoras do EGCG sejam devidas ao bloqueio da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) a nível neuronal, bem como à sua capacidade anti-apoptótica e quelante do ferro. Segundo Herges *et al*. (2011) o efeito neuroprotetor sinérgico, a boa tolerabilidade e o bom perfil de segurança desta combinação tornam-na uma candidata para o tratamento da EM.

8.6.3 Fingolimod

O Fingolimod (FTY720, Gilenya[®]) é um fármaco oral recentemente aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA). Este é considerado um fármaco de primeira linha no tratamento da EMRR pela FDA, enquanto que a EMA considera-o como fármaco de segunda linha. Trata-se de um análogo sintético da miriocina, isolado do fungo *Isaria sinclairii*. O Fingolimod representa o primeiro agente de uma nova classe de fármacos moduladores dos recetores da esfingosina 1-fosfato, apresentando um mecanismo de ação diferente das outras moléculas usadas no tratamento da EM. (Portaccio, 2011)

O Fingolimod é um análogo estrutural sintético da esfingosina 1-fosfato, um lisofosfolípido natural que interage com cinco subtipos conhecidos de recetores da esfingosina 1-fosfato (S1P₁₋₅). (Sobiera, 2011)

O recetor S1P é um segundo mensageiro derivado da esfingomielina, que é responsável por inúmeras respostas celulares, incluindo proliferação, migração, organização citoesquelética e sobrevivência celular. As isoformas S1P₁, S1P₂ e S1P₃ são vastamente expressas no corpo humano, o recetor S1P₄ é expresso nos tecidos linfóides e hematopoiéticos e o S1P₅ é expresso principalmente na substância branca do SNC. (Strader *et al.*, 2011)

O Fingolimod é um pró-fármaco que é rapidamente fosforilado *in vivo* pela esfingosina-quinase em fingolimod-fosfato (FTY720-P). *In vitro*, sabe-se que o FTY720-P pode ligar-se a quatro dos cinco recetores S1P_{1,3,4,5}. (Sobiera, 2011). No entanto, a ligação ao recetor S1P₁ é de particular importância para o mecanismo de ação proposto. O S1P₁ é altamente expresso nos linfócitos T e B e é responsável pela regulação da libertação dos linfócitos do tecido linfóide. A ligação do Fingolimod ao S1P₁ conduz a uma subregulação do recetor

(*downregulation*) com internalização e um subsequente sequestro dos linfócitos nos tecidos linfoides (como nodos linfáticos e placas de Peyer) impedindo a sua recirculação e reduzindo as contagens periféricas de linfócitos até 85%. (Portaccio, 2011) O Fingolimod regula ainda a migração de células B e células dendríticas e recompõe a função de barreira endotelial. (Cohen e Chun, 2011)

Os astrócitos expressam maioritariamente S1P₁ e S1P₃, recetores que se encontram sobre-expressos nas lesões crónicas de EM. Em culturas de astrócitos humanos o Fingolimod mostrou inibir a produção de citocinas inflamatórias. Deste modo, pode adivinhar-se um efeito positivo do Fingolimod sobre os astrócitos no tratamento da EM. (Cohen e Chun, 2011)

No SNC os recetores S1P₅ e S1P₁ são predominantemente expressos pelos oligodendrócitos, em estudos animais o Fingolimod mostrou que estimula a diferenciação de oligodendrócitos quando em baixas concentrações. Sabe-se também que o Fingolimod protege as células progenitoras de oligodendrócitos da apoptose induzida por privação de factores de crescimento, por citocinas inflamatórias e pela ativação das células da micróglia. (Portaccio, 2011)

O Fingolimod também é capaz de estimular a síntese e extensão da membrana celular de oligodendrócitos maduros cultivados a partir de cérebro humano. Estes dados sugerem que o Fingolimod tenha um efeito protetor direto sobre os oligodendrócitos, permitindo a neurorestauração. (Cohen e Chun, 2011)

O agonismo pelos recetores S1P₁ e S1P₅ cerebrais explica mais um efeito neuroprotetor do Fingolimod, uma vez que a subregulação S1P₁ poderá ser responsável pela redução da astrogliose e da angiogénese durante a neuro-inflamação crónica. (Jonhson, 2010)

Deste modo o Fingolimod pode facilitar o restabelecimento da função nervosa e suplementar a reparação endógena do SNC nos doentes com EM.

Estudos em culturas de neurónios identificaram múltiplos efeitos do S1P, como reorganização do citoesqueleto, proteção celular e alterações eletrofisiológicas, contudo atualmente permanece incerto se o Fingolimod exerce efeitos diretos relevantes nos neurónios. (Cohen e Chun, 2011)

O Fingolimod regula ainda a migração de células B e células dendríticas e recompõe a função de barreira endotelial. (Cohen e Chun, 2011)

Aglomerando todos estes mecanismos de ação, facilmente se percebe que o Fingolimod é um fármaco revolucionário quando comparado com as terapias tradicionais da EM, particularmente em termos do seu mecanismo de ação e potencial neuroprotetor. (Ontaneda *et al.*, 2011)

Os principais efeitos secundários do Fingolimod incluem: nasofaringite, cefaleia, diarreia e náuseas. Entre os efeitos adversos mais graves encontram-se a bradicardia, bloqueio aurículo-ventricular de primeiro grau (agonismo S1P a nível cardíaco), dor torácica, elevação de enzimas hepáticas, encefalites pelo Herpes Virus Simplex e infeções disseminadas pelo vírus Varicela Zooster, algumas fatais. (Portaccio, 2011)

Os principais mecanismos de ação do Fingolimod são esquematizados na Fig.5.

Mecanismo de ação do Fingolimod

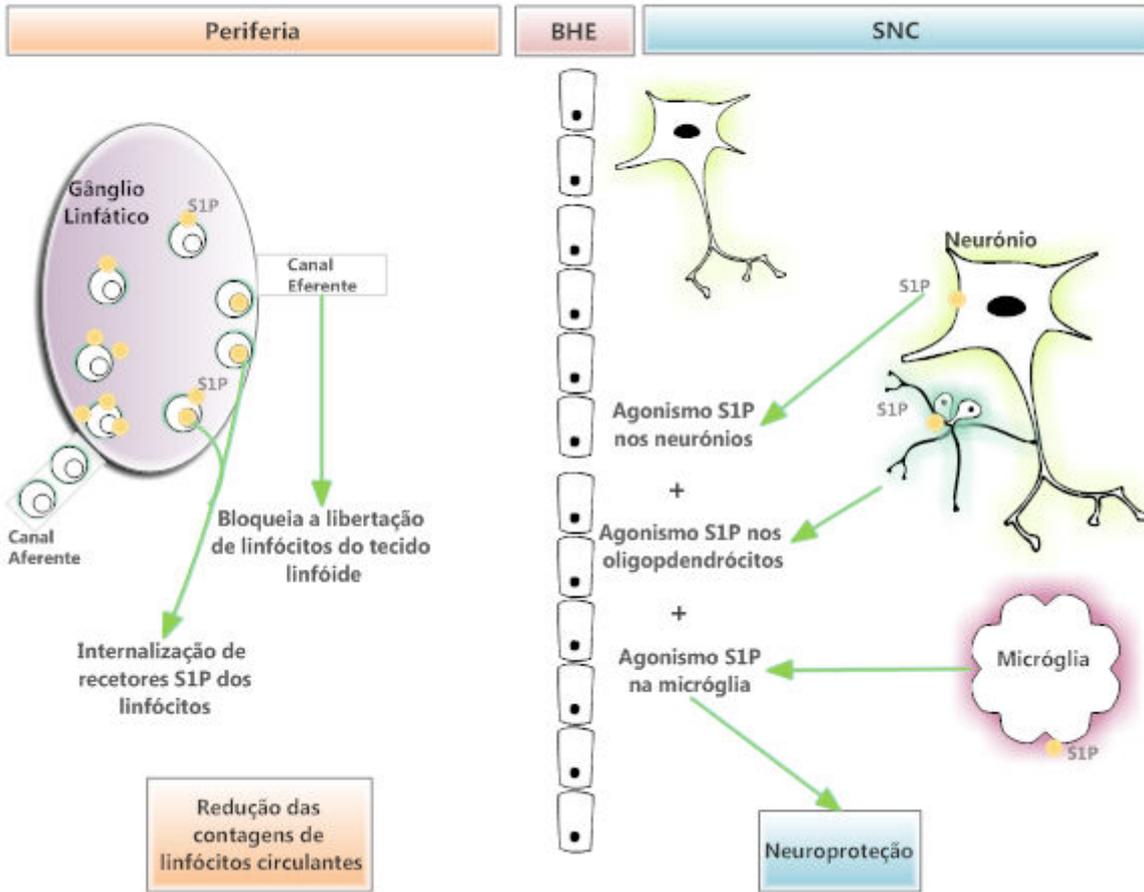


Figura 5. Mecanismo de ação do Fingolimod

O Fingolimod causa internalização dos recetores de esfingosina 1-fosfato, impedindo a saída dos linfócitos dos nódulos linfáticos, reduzindo assim as contagens destas células à periferia. Para além disso o Fingolimod exerce efeitos neuroprotetores através do agonismo S1P nos neurónios, oligodendrócitos e células da micróglia.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.4 Natalizumab

O Natalizumab (Tysabri[®]) é um anticorpo monoclonal humanizado antagonista do recetor da integrina $\alpha 4\beta 1$, com ação anti-VLA-4. O Natalizumab é o primeiro anticorpo monoclonal e o primeiro inibidor seletivo da migração de linfócitos trans-BHE disponível para o tratamento da EM. (Horga e Tintoré, 2011)

Devido às graves reações adversas em que está implicado o seu uso foi restringido, pela EMA, a doentes com EMRR ativa apesar do tratamento com IFN- β e a doentes com formas graves de rápida evolução. (Foley, 2010)

O Natalizumab liga-se à subunidade $\alpha 4$ das integrinas $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$, que se encontram à superfície de todos os leucócitos excepto neutrófilos. Ao ligar-se a esta sub-unidade o Natalizumab inibe a adesão celular $\alpha 4$ mediada dos leucócitos ao recetor VCAM-1 nas células endoteliais. (Skarica *et al.*, 2011) Ao bloquear o VLA-4 o Natalizumab reduz a migração de leucócitos auto-reactivos através da BHE, impedindo que estes linfócitos penetrem no parênquima cerebral e exerçam efeitos deletérios. O Natalizumab impede, também, a ligação do VLA-4 ao VCAM-1 presente nas células apresentadoras de antígeno, pelo que reduz a apresentação e ativação de linfócitos T à periferia. (Foley, 2010)

Deste modo o Natalizumab reduz a migração celular de linfócitos através da BHE e ainda inibe o recrutamento de novas células imunitárias em direção ao tecido neuronal inflamado, reduzindo assim a formação de lesões de EM. (Foley, 2010).

O recetor VLA-4 também é responsável pela ligação dos linfócitos à fibronectina, importante no processo de migração de linfócitos até aos focos de inflamação no interior do parênquima cerebral. (Horga e Tintoré, 2011)

Millonig *et al.* (2010) concluíram que o Natalizumab reduz a migração trans-endotelial através do bloqueio VLA-4 e ainda através de uma redução dos níveis circulantes de VCAM-1. De facto, estes autores identificaram uma redução significativa dos níveis séricos de VCAM-1 cerca de 4 semanas após o início da terapêutica com Natalizumab.

Alguns autores sugerem que o Natalizumab apresente outros efeitos imunomoduladores através da inibição da interação entre a integrina $\alpha 4\beta 1$ e as moléculas da matriz extracelular como a fibronectina e osteopontina ou através da diminuição do número de células dendríticas e da expressão de MHC-II nos espaços perivasculares do SNC. (Horga e Tintoré, 2011)

Mais de 43% dos doentes sofrem efeitos secundários durante a terapêutica com Natalizumab. Os efeitos adversos mais frequentes são: cefaleias, vômitos, artralguas, nasofaringites, tremores, febre, fadiga e reações de hipersensibilidade. (Horga e Tintoré, 2011)

O efeito adverso mais importante da terapêutica com Natalizumab é a Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP). A LMP é uma doença desmielinizante causada pela infeção oportunista aos oligodendrócitos pelo poliomavírus JC. Apesar de rara (incidência estimada de 0,8 por cada 1 000 doentes tratados com 12 ou mais doses e de 1,3 casos por cada 1 000 doentes tratados com 24 doses ou mais), a LMP não tem um tratamento efetivo e pode ser fatal. (Horga e Tintoré, 2011) O quadro clínico é mais frequentemente caracterizado por fraqueza muscular, alterações visuais e alterações do estado mental. Afasia, sinais cerebelares, convulsões e cefaleia também estão associados à LMP. (Foley, 2010)

Para além da duração do tratamento com Natalizumab, a presença de anticorpos anti-JC e a exposição prévia a fármacos imunossupressores são factores que tornam o doente mais susceptível à LMP. Dado que o risco de LMP aumenta com a duração do tratamento alguns

clínicos sugerem uma interrupção transitória da terapêutica, contudo atualmente não existem dados que baseiem esta atitude. (Foley, 2010)

O Finategrast (SB683699) é um novo fármaco similar ao Natalizumab. Apresenta uma ação anti-VLA-4 e pode ser administrado oralmente. Atualmente encontra-se em ensaios clínico fase II para obter aprovação no tratamento da EMRR. (Prat e Stüve, 2012)

Os principais mecanismos de ação do Natalizumab são ilustrados na Fig.6.

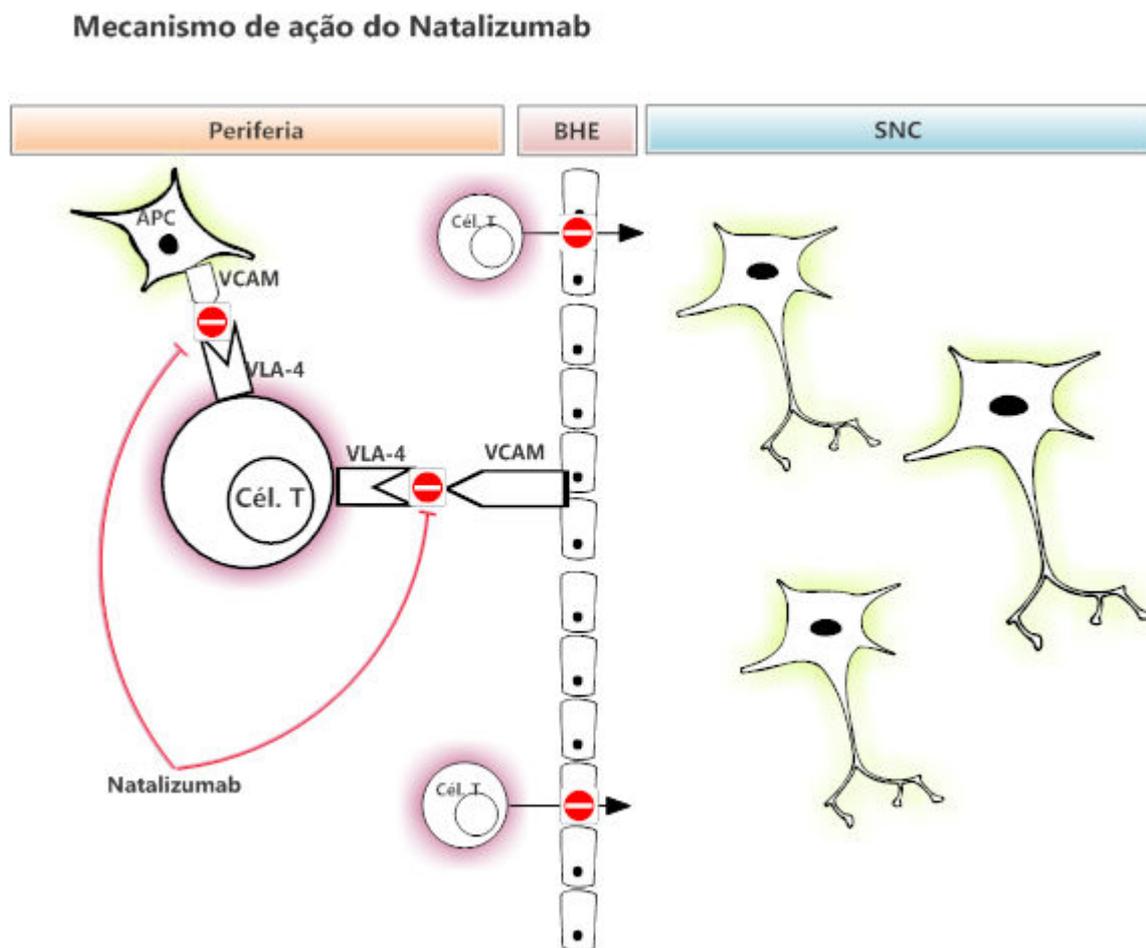


Figura 6. Mecanismo de ação do Natalizumab

O Natalizumab bloqueia o VLA-4 reduzindo a migração de leucócitos auto-reativos através da BHE. Este fármaco impede, também, a ligação do VLA-4 ao VCAM-1 das APC's, reduzindo a apresentação e ativação de linfócitos T à periferia.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.5 Rituximab, Ocrelizumab e Ofatumumab

O Rituximab (Mabthera[®]) é um anticorpo monoclonal quimérico contra a molécula de superfície CD20. Encontra-se aprovado em Portugal para a terapêutica de Linfomas de Células B e parece um fármaco promissor no tratamento da EM.

Um estudo fase II duplamente cego contra placebo mostrou que o Rituximab causa uma redução significativa do aparecimento de novas lesões na Ressonância Magnética e da taxa de recaídas. O mecanismo através do qual o Rituximab exerce estes efeitos permanece em parte desconhecido. (Monson *et al.*, 2011)

De facto, o antigénio de superfície CD20 está presente essencialmente nos linfócitos B. Esta glicoproteína só se encontra nas células B maduras ou pré-maduras, não é expressa nas células hematopoiéticas, nem nos plasmócitos. Assim, o rápido efeito do Rituximab na EM não pode ser explicado pela ação nos plasmócitos. Este efeito pode ser justificado pela ação inibidora do Rituximab no processo de apresentação de antigénios às células T mediado pelos linfócitos B. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

Na realidade, o Rituximab liga-se ao recetor CD20 das células B causando Citotoxicidade mediada por Células Dependente de Anticorpos (ADCC), bem como Citotoxicidade dependente do Sistema do Complemento. De facto, a ligação do Rituximab causa ativação da cascata do Complemento, iniciando o complexo de ataque de membrana que causa diretamente a lise de células B, a designada Citotoxicidade mediada pelo Complemento. A ativação do Complemento causa também depósito das frações C3B/iC3b que permitem o reconhecimento pelos recetores FC γ e pelos recetores 1 e 3 dos macrófagos, o que permite a fagocitose e ADCC. A citotoxicidade do tipo ADCC também é estimulada pela interação entre Linfócito B e célula NK, estimulada pelo Rituximab. (Taylor, 2007)

Na EAE, a administração de Rituximab causa uma rápida depleção de linfócitos B à periferia, reduzindo a gravidade da doença. O tratamento com Rituximab provoca, também, uma diminuição das reações de Hipersensibilidade do tipo retardado (*Delayed Type Hypersensitivity*), bem como a redução da proliferação das células T e produção de IL-17. (Monson *et al.*, 2011)

Na Fig.7 é ilustrado o mecanismo de ação do Rituximab.

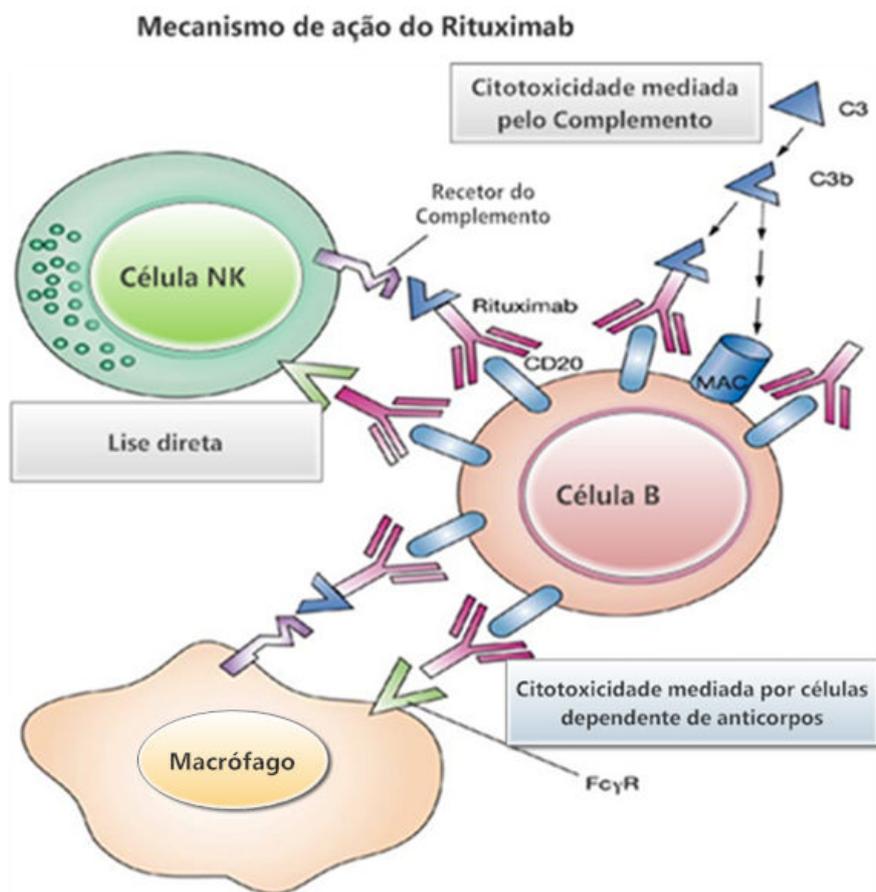


Figura 7. Mecanismo de ação do Rituximab

O Rituximab exerce Citotoxicidade mediada pelo Complemento causando lise direta de células B. A ativação do Complemento causa também depósito das frações C3B/iC3b estimulando a fagocitose e Citotoxicidade mediada por Células Dependente de Anticorpos (ADCC). A interação com células NK causa lise direta dos linfócitos B.

Fonte: Adaptado de Taylor, 2007.

Na realidade, a administração de Rituximab altera a distribuição de células T CD4⁺ pelo sangue, baço e gânglios linfáticos, altera a proliferação de células T e diminui a produção de IL-17. Deste modo, pode concluir-se que os principais efeitos do Rituximab não são devidos a uma depleção direta de células T, mas sim devido ao papel crítico dos linfócitos B na indução e manutenção da neuroinflamação. Este resultado também pode sugerir que o Rituximab atua de uma forma dependente do tecido não causando uma imunossupressão generalizada. (Monson *et al.*, 2011)

As linfopénias induzidas pelo Rituximab são duradoiras e relativamente seletivas para as células B. Contudo o facto de os plasmócitos não constituírem alvos do Rituximab poderá proporcionar um certo grau de defesa imunológica. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

Em termos de tolerabilidade e segurança, os estudos HERMES e OLYMPUS revelaram que o Rituximab pode causar reações infusionais mais frequentes nas primeiras administrações. Mostraram, também, que o Rituximab está associado a um maior risco de infeções, entre as quais LMP. (Horga e Tintoré, 2011)

Estão a ser estudados outros anticorpos monoclonais anti-CD20: o Ocrelizumab (humanizado) e o Ofatumumab (humano) que em princípio trarão mais vantagens do que o Rituximab (quimérico), principalmente no que respeita à redução das reações à infusão do fármaco. (Krieger, 2011)

O Ocrelizumab encontra-se em estudos fase III para obter aprovação no tratamento da EM, contudo os ensaios clínicos que testavam este fármaco no tratamento do Lupus Eritematoso Sistémico e Artrite Reumatoide foram suspensos, devido ao aparecimento de efeitos secundários graves como infeções oportunistas, muitas das quais fatais. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

O Ofatumumab é um anticorpo monoclonal humano anti-CD20 IgG1 κ , que difere do Rituximab, na medida em que se liga a um epítipo mais superficial do CD20 e se dissocia deste antígeno de uma forma mais lenta. (Zhang, 2009)

O Ofatumumab está aprovado no tratamento da Leucemia Linfocítica Crónica pela EMA e FDA. Encontra-se em estudos fase II: MIRROR (Sastre-Garriga e Montalban, 2011).

8.6.6 Daclizumab

O Daclizumab (Zenapax®) é um anticorpo monoclonal humanizado contra o antígeno de superfície CD25, usado na prevenção da rejeição de transplantes alogénicos (Krieger, 2011). Este fármaco promove imunotolerância nos transplantados, na uveíte inflamatória e na EM. (Wuest *et al.*, 2011)

Na realidade, o CD25 corresponde à cadeia α do recetor (de baixa e elevada afinidade) da IL-2, citocina pró-inflamatória fundamental na ativação do linfócito T. O recetor de média afinidade não é bloqueado pelo Daclizumab pois este é constituído apenas pela cadeia β e γ . (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

O Daclizumab liga-se de modo seletivo à subunidade α do IL-2R nas células T e causa uma redução da atividade da IL-2 circulante em excesso, provocando uma proliferação de células CD56⁺. Acredita-se que o efeito no tratamento da EM seja maioritariamente devido à propagação de uma população de células NK, com elevada expressão de CD56^{bright} (células CD56^{bright}) que intervêm como células reguladoras da imunidade, através da eliminação de células T. De facto, observa-se uma forte correlação entre a expansão de células CD56^{bright} nos doentes tratados com Daclizumab e a redução da atividade inflamatória no SNC sugerindo que este é um mecanismo importante no efeito terapêutico deste anticorpo monoclonal. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

Wuest *et al.* (2011) verificaram que o Daclizumab tem um efeito limitado na inibição da ativação de células T e que o principal mecanismo de ação é na realidade uma potente inibição da apresentação de antígenos pelas células dendríticas às células T.

Em contrapartida, estudos recentes sugerem que os fenómenos autoimunes maioritariamente cutâneos que se verificam durante o uso de Daclizumab se possam dever a uma redução das

células $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+ T_{reg}$. Este dado é corroborado por estudos que mostraram que a deleção do gene CD25 causa autoimunidade. (Wuest *et al.*, 2011)

Os principais mecanismos de ação do Daclizumab são esquematizados na Fig.8

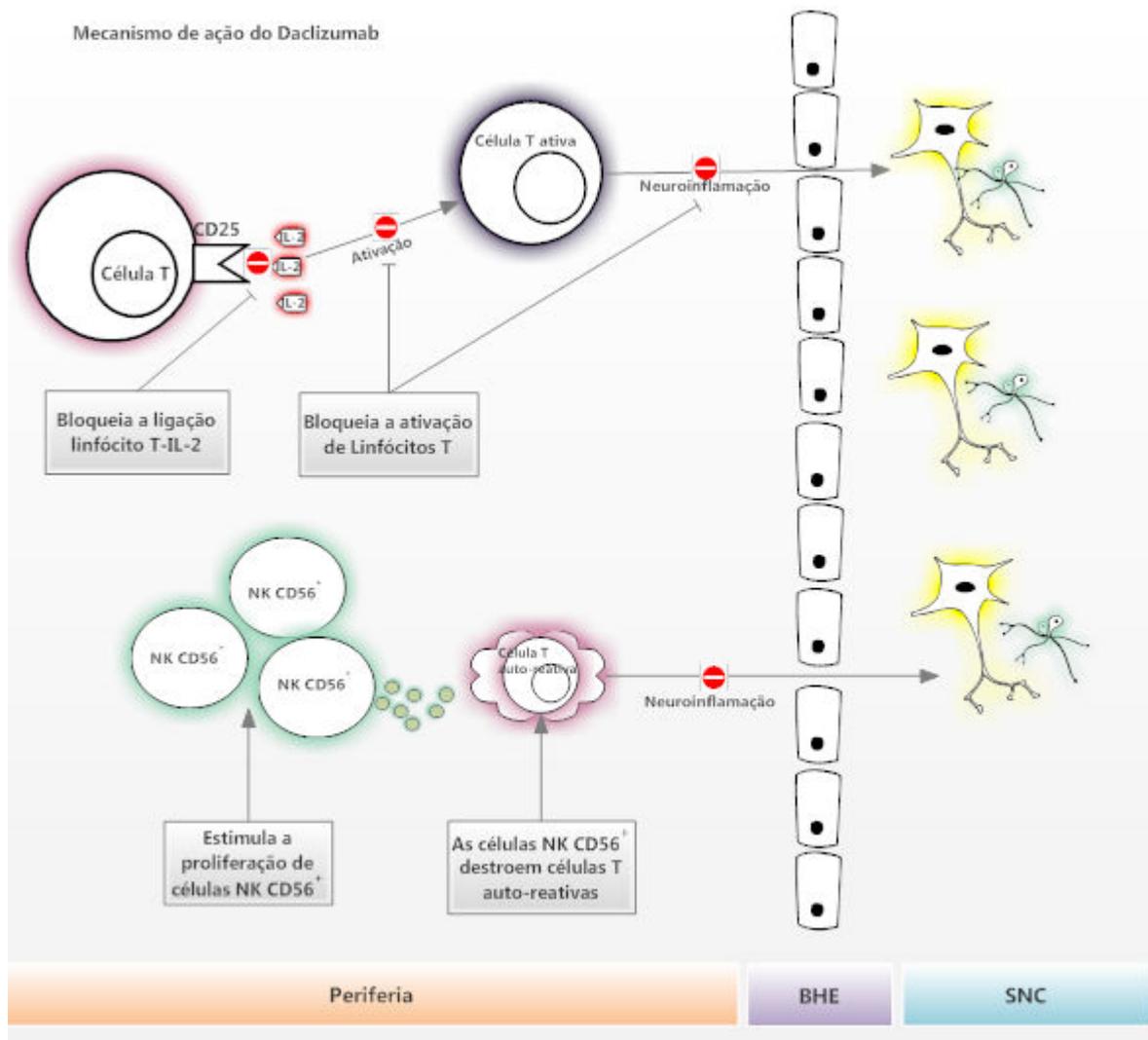


Figura 8. Mecanismo de ação do Daclizumab

O Daclizumab liga-se ao recetor CD25 nas células T e causa uma redução da atividade da IL-2, provocando uma redução da proliferação de linfócitos. Para além disso o Daclizumab induz ainda a proliferação de células NK $CD56^+$ que intervêm como células reguladoras da imunidade, através da eliminação de células T auto-retivas.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.7 Alemtuzumab

O Alemtuzumab (MabCampath[®]) é um anticorpo monoclonal IgG1 humanizado contra o antígeno CD52, utilizado no tratamento da Leucemia Linfocítica Crônica de Células B e que se encontra em estudo para obter aprovação no tratamento da EM. (Krieger, 2011)

O CD52 é uma glicoproteína presente na superfície da maioria das células do Sistema Imunitário. Este recetor é expresso pelos linfócitos B e T em elevadas quantidades. Os monócitos, macrófagos e eosinófilos também expressam esta glicoproteína mas em quantidades menores. As células NK, neutrófilos e células hematopoiéticas não expressam o recetor CD52. (Krieger, 2011; Yanping *et al.*, 2009)

A função biológica exata do CD52 permanece pouco clara, contudo algumas evidências sugerem que está envolvido na migração de células T e na sua co-estimulação. (Yanping *et al.*, 2009)

Estudos *in vitro* indicam que a imunossupressão provocada pelo Alemtuzumab é devida a vários mecanismos como: a lise direta, Citotoxicidade dependente do Complemento, Citotoxicidade mediada por Células Dependente de Anticorpos (ADCC) e indução de apoptose, contudo a verdadeira extensão dos vários mecanismos *in vivo* permanece por esclarecer (Yanping *et al.*, 2009)

De facto, o tratamento com Alemtuzumab causa uma depleção rápida e prolongada das células que expressam a glicoproteína CD52, como é o caso dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B, monócitos, células dendríticas e granulócitos. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011) As contagens de células NK não são afetadas, uma vez que estas células não expressam CD52. (Yanping *et al.*, 2009)

Paradoxalmente esta depleção é acompanhada de uma resposta homeostática com aumento da regeneração das células B CD19⁺, que pode durar por mais de um ano. (Krieger, 2011) Num estudo com ratos transgênicos verificou-se, ainda, que o tratamento com Alemtuzumab condiciona um aumento das contagens de neutrófilos no sangue e no baço. Constatou-se, também, um aumento de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ no sangue, o que poderá fornecer uma proteção a longo prazo na evolução da EM. (Yanping *et al.*, 2009)

A distribuição quase ubiqüitária do CD52, condiciona uma imunossupressão intensa e prolongada quando se utiliza o Alemtuzumab. Contudo esta glicoproteína não é expressa nas células hematopoiéticas progenitoras e por isso a depleção imune não é tão grave no baço, nódulos linfáticos, medula óssea e timo. (Sastre-Garriga e Montalban, 2011)

Assim durante o tratamento com Alemtuzumab vários componentes da imunidade inata permanecem relativamente preservados: neutrófilos, células NK e macrófagos, para além disso a preservação de *pools* de linfócitos contribuem para a baixa incidência de infeções mesmo com linfopénias graves e prolongadas. (Yanping *et al.*, 2009)

Na realidade, o Alemtuzumab poderá ser uma das moléculas mais eficazes no tratamento da EM de entre os vários fármacos que se encontram atualmente em investigação. (Krieger, 2011)

Decorrem estudos de fase III (CARE-MS1e CARE-MS2) com intuito principal de identificar o risco de reações adversas durante o tratamento com Alemtuzumab, como a Purpura Trombocitopénica Imune e a Doença de Graves. (Krieger, 2011)

O seu mecanismo de ação do Alemtuzumab é esquematizado na Fig.9.

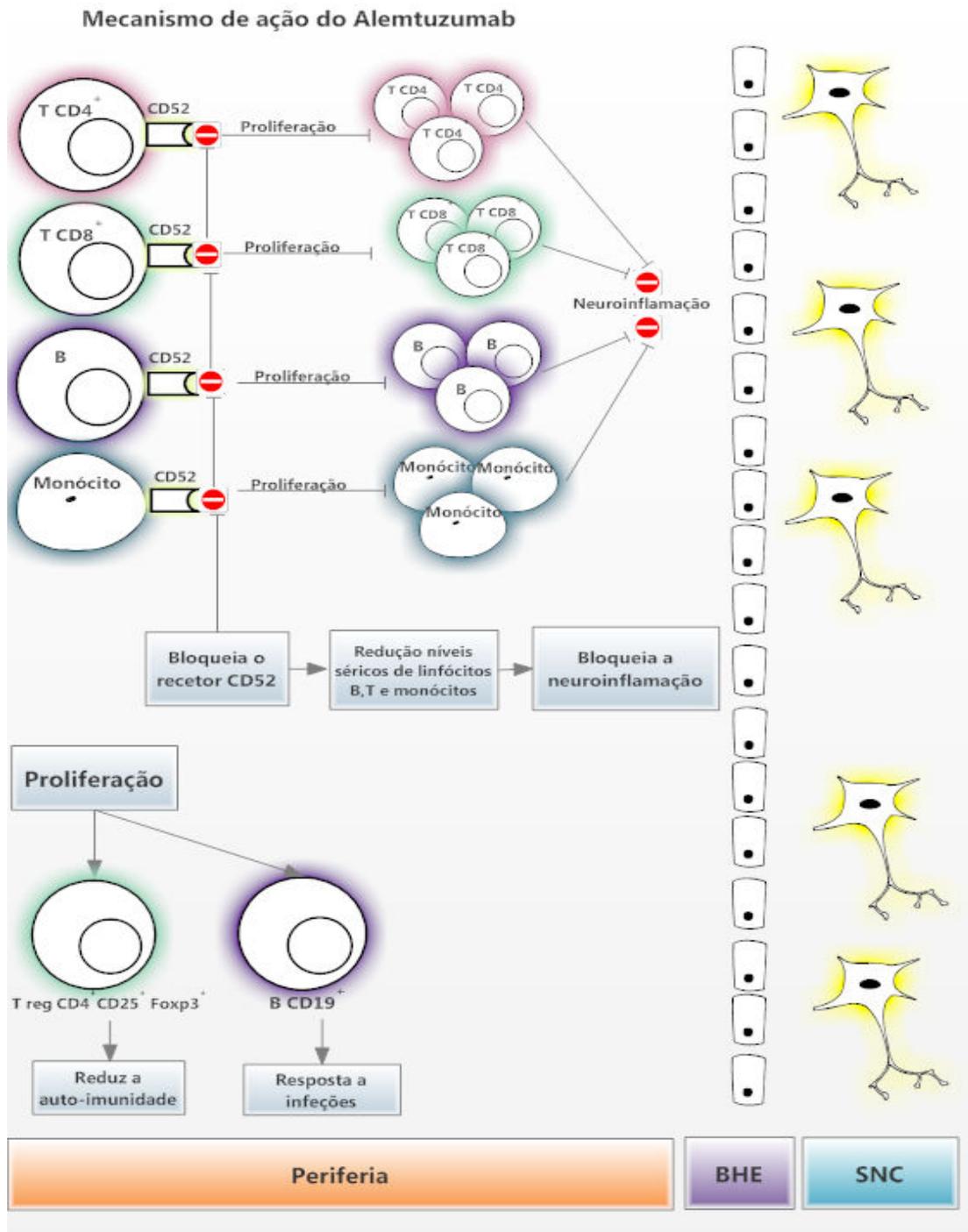


Figura 9. Mecanismo de ação do Alemtuzumab

O bloqueio CD52 exercido pelo Alemtuzumab causa uma depleção de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, B e monócitos com redução da neuro-inflamação. A expansão de células T_{reg} CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, permite a destruição de células T auto-reativas. Paralelamente, o aumento da proliferação das células B CD19⁺ confere proteção contra infecções.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.8 BG-12

O BG-12 (dimetil fumarato) foi introduzido em 1950 para tratar a Psoríase. (Fox, 2010) Atualmente encontra-se em investigação fase III para ser aprovado como monoterapia oral na EMRR. (Johnson, 2010)

O mecanismo de ação do BG-12 não se encontra totalmente esclarecido, sendo geralmente descrito como um imunomodulador. Mais especificamente poderá reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) e inibir a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, E-selectina) envolvidas no processo de transmigração das células imunitárias em direção ao SNC. (Nicholas *et al.*, 2011) Assim, o BG-12 reduz a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10, causando um balanço positivo da imunidade T_H2. (Nicholas *et al.*, 2011)

Para além disto, estudos recentes mostraram que o BG-12, na fase aguda da EAE induz uma redução significativa da infiltração de macrófagos/micróglia. (Nicholas *et al.*, 2011).

Apesar de o BG-12 ter sido inicialmente proposto para o tratamento da EM, devido ao seu efeito inibidor na ativação de linfócitos, atualmente é-lhe reconhecido um potencial neuroprotetor. (Lin *et al.*, 2011)

Um estudo levado a cabo por Linker *et al.* (2011) em ratos com EAE, mostrou que o BG-12, numa fase tardia da doença, exerce efeitos neuroprotetores dependentes do factor nuclear Nrf2 (*Nuclear-Related Factor erythroidderived 2*), relevante nas vias de stress oxidativo.

A indução da transcrição do factor Nrf 2 pelo BG-12 exerce efeitos moduladores do stress oxidativo, através da indução de genes de destoxificação de fase II. (Nicholas *et al.*, 2011) Assim o BG-12 induz efeitos protetores no oligodendrócito, na mielina, nos axónios e

neurónios *in vivo* através da redução do stress oxidativo. (Linker *et al.*, 2011) Estudos pré-clínicos mostraram que a ativação da via Nrf2 para além de ter efeitos anti-oxidantes, protege a BHE, permite a manutenção da integridade da mielina e ainda inibe fenómenos de excitotoxicidade. (Nicholas *et al.*, 2011)

Assim o tratamento com BG-12 permitiu uma redução da destruição de neurónios e células gliais no modelo experimental da EM. (Linker *et al.*, 2011)

O BG-12 aumenta, ainda, os níveis de glutathione nos astrócitos e células da micróglia, causando um aumento da expressão da proteína anti-inflamatória heme oxigenase-1. (Lin *et al.*, 2011)

Deste modo, o BG-12 assume um papel especial no mundo da terapêutica da EM, uma vez que permite uma abordagem neuroprotetora e anti-oxidante para além da imunomodulação. (Linker *et al.*, 2011)

Em termos de segurança, os efeitos secundários mais frequentemente associados ao BG-12 são: *flushing*, cefaleia, sintomas gastrointestinais e rinofaringites. À data, não se identificou um aumento de infeções oportunistas. (Johnson, 2010)

Na Fig. 10 são esquematizados os principais mecanismos de ação do BG-12.

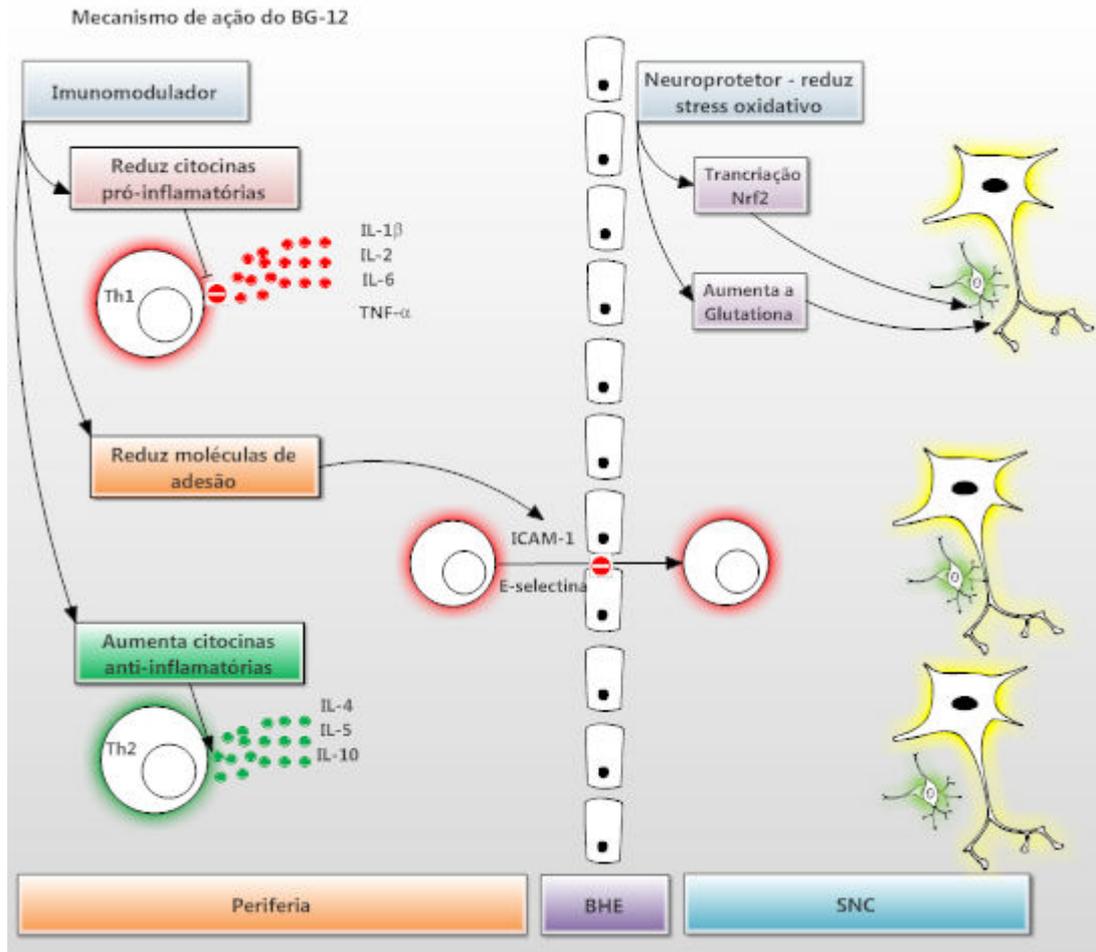


Figura 10. Mecanismo de ação do BG-12.

O BG-12 tem ação imunomoduladora: reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α) e inibe a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10, inibe ainda a expressão de moléculas de adesão (ICAM-1, E-selectina). O BG-12 exerce ainda efeitos neuroprotetores através do factor Nrf2 e do aumento da produção de glutaciona.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.9 Imunoglobulina G endovenosa

A Imunoglobulina G endovenosa (IGIV) é usada de forma “*off label*” na prevenção ou no tratamento de surtos severos na EM. Um estudo recente mostrou que a infusão profiláctica de IGIV previne o desenvolvimento da EAE. (Ephrem *et al.*, 2008). Uma revisão sistemática recente, também, concluiu que a IGIV reduz a taxa de surtos e aumenta o intervalo de tempo livre de surtos, contudo não existe evidência científica robusta de que esta terapêutica possa atrasar a progressão da EM. (Gray *et al.*, 2010)

A IGIV foi inicialmente introduzida no tratamento de doenças desmielinizantes (e.g. Síndrome Guillain-Barré) devido à sua capacidade de suprimir a atividade de autoanticorpos. Contudo atualmente acredita-se que a IGIV exerça efeitos imunomoduladores a outros níveis: produção de citocinas, linfócitos T, recetores Fc, linfócitos B, células dendríticas e no Sistema do Complemento (Jorgensen e Sorensen, 2005), para além de possíveis efeitos neuroprotetores. (Wootla *et al.*, 2011)

Na realidade, as preparações comerciais de Imunoglobulinas correspondem a uma mistura de anticorpos policlonais, obtidas através da purificação de sangue de dadores saudáveis. (Ohkuma *et al.*, 2007).

A IGIV apresenta um efeito bastante precoce na neutralização de autoanticorpos circulantes. Acredita-se que esta neutralização seja dependente da ligação de anticorpos anti-idiotipos às regiões V dos autoanticorpos, constituindo a designada reação anti-idiotípica. (Ohkuma *et al.*, 2007)

Num estudo levado a cabo por Ephrem e colegas concluiu-se que a IGIV aumenta o número e ação das células T_{reg} CD4⁺CD25⁺ Foxp3, células chave no controlo da imunidade.

A IGIV reduz, ainda, a produção de citocinas pró- inflamatórias como a IL-1, IL-2, IL-6, INF- γ e do recetor de IL-2. (Sorensen, 1994) Para além disso a IGIV bloqueia os recetores Fc na superfície dos linfócitos B e macrófagos, reduzindo a atividade destas células efetoras. (Baleva e Nikolov, 2011)

Também é reconhecido um efeito da IGIV nas células dendríticas. De facto, esta terapêutica inibe parcialmente a expressão de CD1a (marcador de células dendríticas imaturas), CD40 e CD80 (marcadores associados à ativação de células T) e inibe fortemente a expressão de CD49d ou VLA-4, molécula de adesão necessária à migração trans-BHE das células dendríticas maduras. (Ohkuma *et al.*, 2007)

As imunoglobulinas ligam-se, ainda, às fracções C3b e C4b do Complemento, inibindo a Citotoxicidade dependente do Complemento. (Sorensen, 1994)

Estudos recentes mostraram um potencial neuroprotetor da IGIV. Acredita-se que este efeito é mediado por certos anticorpos contra antígenos da mielina. Estes anticorpos auto-reativos com potencial de remielinização ocorrem naturalmente no plasma de indivíduos saudáveis como é o caso das imunoglobulinas sHIgM22, sHIgM46, sHIgM12 e sHIgM42. Estas imunoglobulinas ligam-se aos oligodendrócitos e inibem a apoptose através da redução das caspases 3 e 9. Para além disso estes anticorpos permitem a limpeza de restos de mielina dos locais de lesão. (Wootla *et al.*, 2011)

Desta forma, as preparações de IGIV poderão apresentar um valor terapêutico na EM não apenas pelo seu efeito anti-inflamatório, mas também pelo potencial efeito na remielinização. Os seus principais mecanismos de ação são ilustrados na Fig.11.

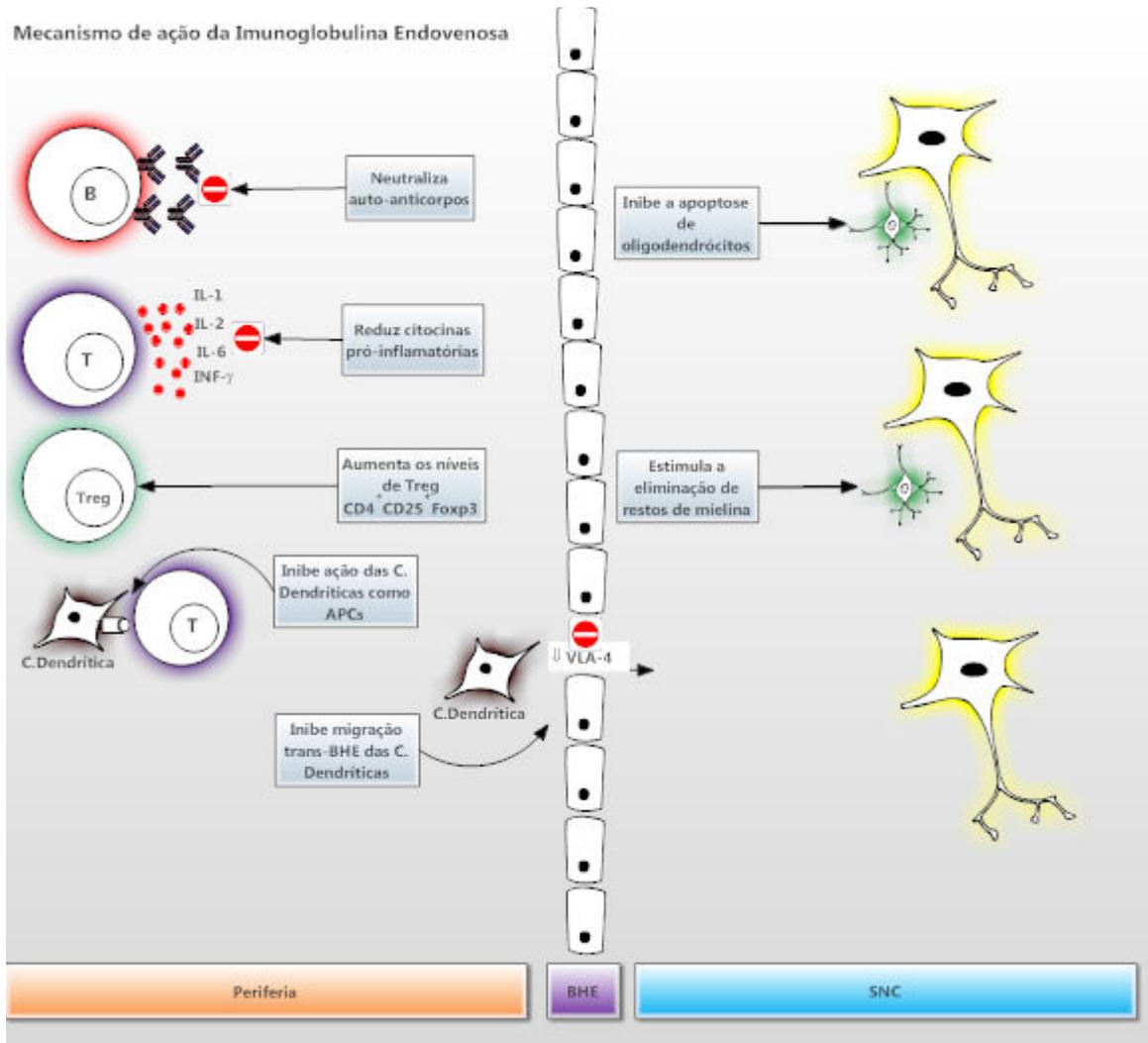


Figura 11. Mecanismo de ação da Imunoglobulina G endovenosa.

A IGIV neutraliza rapidamente autoanticorpos. Para além disso, inibe a secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta o número e função das células reguladoras da imunidade T_{reg} . Inibe ainda a ação e migração de células dendríticas. A Imunoglobulina também apresenta efeitos neuroprotetores: inibindo a apoptose de oligodendrócitos e removendo restos de mielina dos locais de lesão.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.10 Cladribina

A Cladribina é um fármaco imunossupressor utilizado no tratamento de Leucemia de Células Cabeludas, que se encontra em estudos de fase III para obter aprovação no tratamento da EMRR. (Fox, 2010)

Trata-se de um análogo sintético dos nucleosídeos, resistente à adenosina-desaminase que apresenta uma toxicidade seletiva para linfócitos e monócitos. Esta seletividade é devida aos elevados níveis de deoxicitidina cinase e reduzidas quantidades de 5-nucleotidase (enzima que degrada a Cladribina) que estas células apresentam. O déficit de 5-nucleotidase dos linfócitos e monócitos condiciona uma reduzida metabolização da Cladribina que se acumula nestas células. (Jones e Coles, 2010)

O análogo dos nucleosídeos é então incorporado na molécula de DNA, condicionando uma interrupção da síntese do DNA e subsequentemente apoptose. (Marriott e O'Connor, 2010) Assim a Cladribina induz uma redução dos níveis de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺, apresentando pouca influência nos níveis de linfócitos B. (Warnke *et al.*, 2010)

Evidências recentes sugerem que a Cladribina também reduz a capacidade migratória trans-BHE das células T CD4⁺, CD8⁺ e em menor intensidade a dos monócitos CD14⁺. E poderá influenciar, ainda, os níveis de moléculas de adesão solúveis como sICAM ou sE-Selectina. (Nicholas *et al.*, 2011) A Cladribina inibe, ainda, a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2 (e o seu recetor) e a IL-8. (Nicholas *et al.*, 2011)

Os efeitos secundários mais relevantes são a linfopénia, infeções (Herpes Zoster) e neoplasias. (Jones e Coles, 2010; Yanping *et al.*, 2009) A toxicidade parece ser dose-dependente e o tratamento com doses superiores a 0.1 mg/kg encontra-se mais associado a mielossupressão, infeções sistémicas, nefrotoxicidade aguda e neuropatia. (Warnke *et al.*, 2010)

A Cladribina é eficaz no tratamento da EM e o facto de ser utilizada numa formulação oral, com boa comodidade posológica, condiciona uma melhor adesão terapêutica. Contudo devido ao seu potencial risco cancerígeno, a aprovação da Cladribina na terapêutica da EM foi rejeitada pela EMA.

O mecanismo de ação da Cladribina é ilustrado na Fig.12.

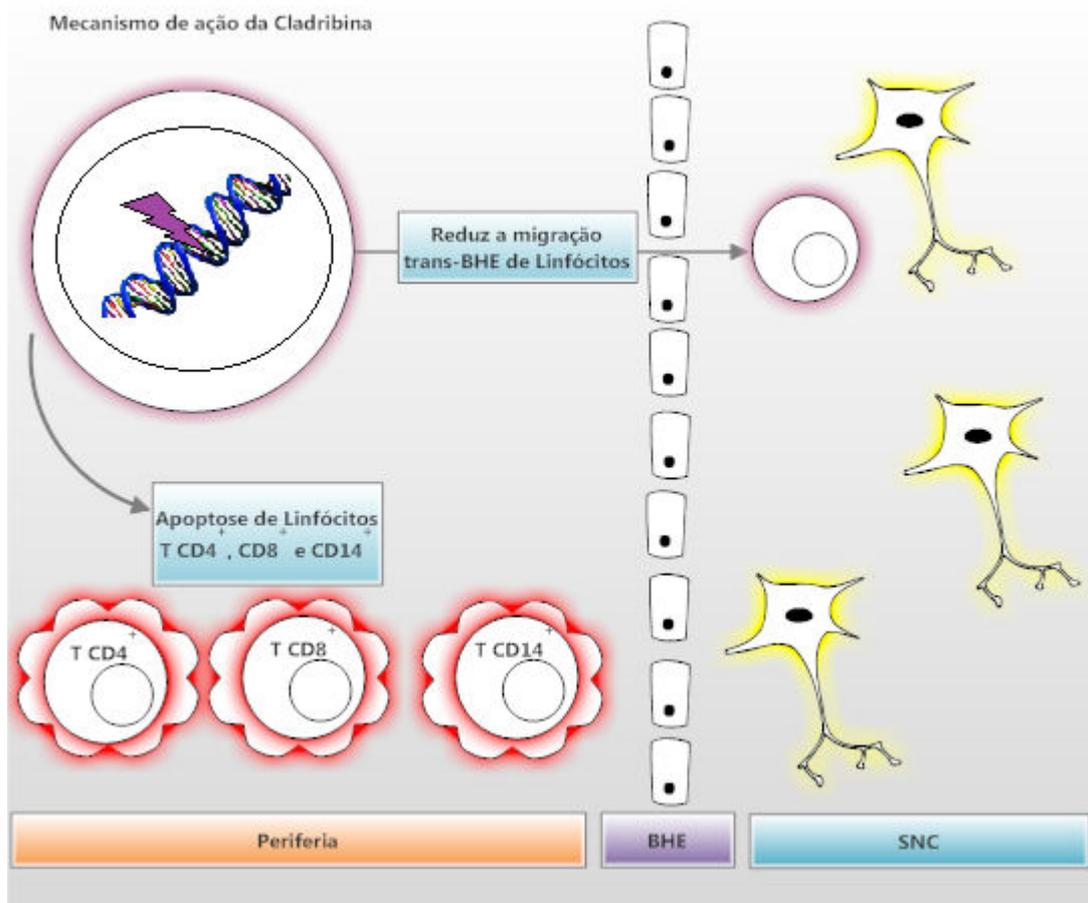


Figura 12. Mecanismo de ação da Cladribina

A Cladribina acumula-se nos linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺, incorpora-se no DNA causando apoptose e redução dos níveis circulantes destes tipos celulares. A Cladribina também reduz a capacidade migratória trans-BHE das células T CD4⁺, CD8⁺ e em menor intensidade a dos monócitos CD14⁺.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.11 Laquinimod

O Laquinimod é um fármaco promissor no tratamento da EMRR, que se encontra, atualmente, em investigação fase III. Este poderá vir a integrar o reduto grupo de fármacos orais disponíveis para tratar a EM.

O Laquinimod é um composto quimicamente relacionado com Roquinimex (Linomide), fármaco que mostrou eficácia no tratamento da EMRR, mas que foi descontinuado devido a efeitos secundários substanciais, como a cardiotoxicidade (pericardite e enfarte do miocárdio). (Fernández, 2011; Thone e Gold, 2011)

Um conjunto de modificações químicas foi aplicado ao Roquinimex, conferindo à nova molécula (Laquinimod) um perfil toxicológico e farmacológico mais favorável, bem como uma potência superior como inibidor do curso da EM. (Nicholas *et al.*, 2011) Assim o Laquinimod combina a eficácia do Linomide, apresentando um perfil de segurança melhorado. (Thone e Gold, 2011)

O seu mecanismo de ação permanece em estudo, contudo alguns ensaios sugerem uma ação anti-inflamatória e neuroprotetora independentes. (Fernández, 2011)

O Laquinimod mostrou eficácia no modelo experimental da EM, a EAE, prevenindo o seu aparecimento e mostrando igual eficácia na fase aguda e crónica da EAE. (Thone e Gold, 2011)

Acredita-se que o efeito imunomodulador do Laquinimod se consubstancializa através de um *shift* no balanço T_H1/T_H2 , incrementando a resposta anti-inflamatória T_H2 e T_H3 e aumentando a libertação de TGF- β , IL-4 e IL-10. (Fernández, 2011)

O Laquinimod reduz ainda a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF- α . (Fernández, 2011)

Estudos *in vitro* mostraram que o Laquinimod induz a supressão de genes associados à via NF-kB (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), promovendo a apoptose dos linfócitos TCD8⁺ e B. (Thone e Gold, 2011)

Outro efeito imunomodulador do Laquinimod consiste na supressão da apresentação de antígenos do MHC-II e na redução da disseminação de epítopos. (Nicholas *et al.*, 2011) Para além disso o Laquinimod parece suprimir o VLA-4 (em estudos animais) reduzindo a migração de linfócitos através da BHE. O Laquinimod inibe, ainda, a resposta T_h17 pró-inflamatória, reduzindo a produção de IL-17 *in vitro*. (Fernández, 2011)

O efeito neuroprotetor do Laquinimod parece relacionar-se com a produção de factores neurotróficos como o BDNF, para além da redução do grau de infiltração de macrófagos e linfócitos T, reduzindo a desmielinização e o dano axonal. (Fernández, 2011)

Devido ao perfil de segurança melhorado os principais efeitos adversos da terapêutica com Laquinimod são a elevação de enzimas hepáticas e do fibrinogénio, infeções respiratórias, cefaleia, astenia, artralgia, diarreia. (Thone e Gold, 2011)

O mecanismo de ação do Laquinimod é esquematizado na Fig.13.

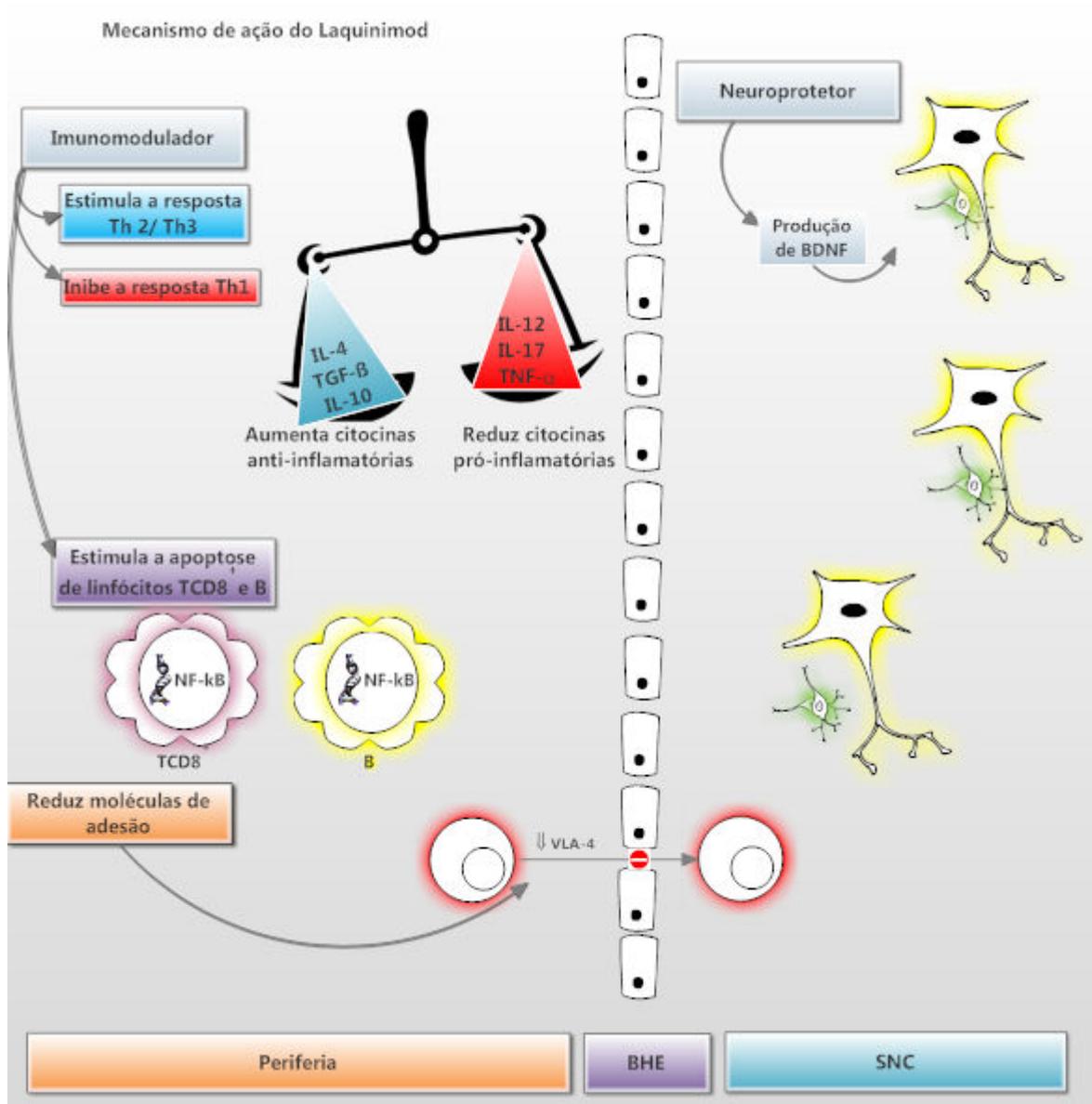


Figura 13. Mecanismo de ação do Laquinimod.

O Laquinimod apresenta um efeito imunomodulador: aumenta a produção de citocinas anti-inflamatórias: TGF-β; IL-4 e IL-10, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF-α, incrementando a resposta T_H2 e T_H3. O Laquinimod induz a supressão de genes da via NF-κB promovendo a apoptose dos linfócitos TCD8⁺ e B. Para além disso o Laquinimod parece suprimir o VLA-4 a migração de linfócitos através da BHE. O efeito neuroprotetor do Laquinimod deve-se à produção do factor BDNF.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.12 Teriflunomida

A Teriflunomida é um fármaco derivado da Leflunomida usada no tratamento da Artrite Reumatoide, com estudos fase III concluídos e aguardar aprovação para o tratamento da EM. (Claussen e Korn, 2012)

A Teriflunomida é um inibidor não competitivo reversível do enzima dihidroorotato desidrogenase (DHODH), uma proteína de membrana mitocondrial essencial à síntese *de novo* das pirimidinas. A inibição da DHODH impede a expansão clonal das células B e T bem como a produção de anticorpos. Este fármaco apresenta, assim, um efeito supressor direto nos linfócitos B, reduzindo a proliferação e síntese de IgM e IgG1. (Nicholas *et al.*, 2011)

Na realidade, quando os linfócitos se encontram num estado de repouso, mesmo quando submetidos à ação da Teriflunomida conseguem recompor o *pool* de pirimidinas através da uma via de *salvage*, através de um processo catabólico que é suficiente para satisfazer as necessidades de síntese de fosfolípidos para a manutenção da membrana e produção de segundos mensageiros. Contudo, quando os linfócitos se encontram num estado proliferativo, a necessidade de pirimidinas aumenta de forma desproporcional e a síntese *de novo* das pirimidinas torna-se totalmente necessária para a síntese de novas moléculas de DNA. Como a Teriflunomida inibe a enzima chave da síntese de novo das pirimidinas, bloqueia a proliferação de linfócitos B e T. (Claussen e Korn, 2012)

Para além disto, modifica a função CD43 e LFA-1 das células T. A Teriflunomida interfere, ainda, com a sinalização de cálcio, impedindo a ativação de células T a quando da apresentação de antígenos. A alteração da função das integrinas traduz, provavelmente, uma redução da capacidade migratória de células T. (Claussen e Korn, 2012)

A Teriflunomida inibe a sinalização intracelular Jak1 e Jak2, necessária aos recetores de múltiplas citocinas como a IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 em células T de ratinhos. (Claussen e Korn, 2012) Acredita-se que este fármaco estimule a diferenciação de células T_H2 e reduza a proliferação de linfócitos produtores de IFN- γ . (Claussen e Korn, 2012)

Os principais efeitos adversos da Teriflunomida incluem: teratogenicidade, sintomas gastrointestinais como diarreia, dispepsia, náusea e vômitos, elevação de enzimas hepáticos, alopecia, hipertensão arterial e infeções. (Claussen e Korn, 2012)

O mecanismo de ação da Teriflunomida é representado na Fig.14.

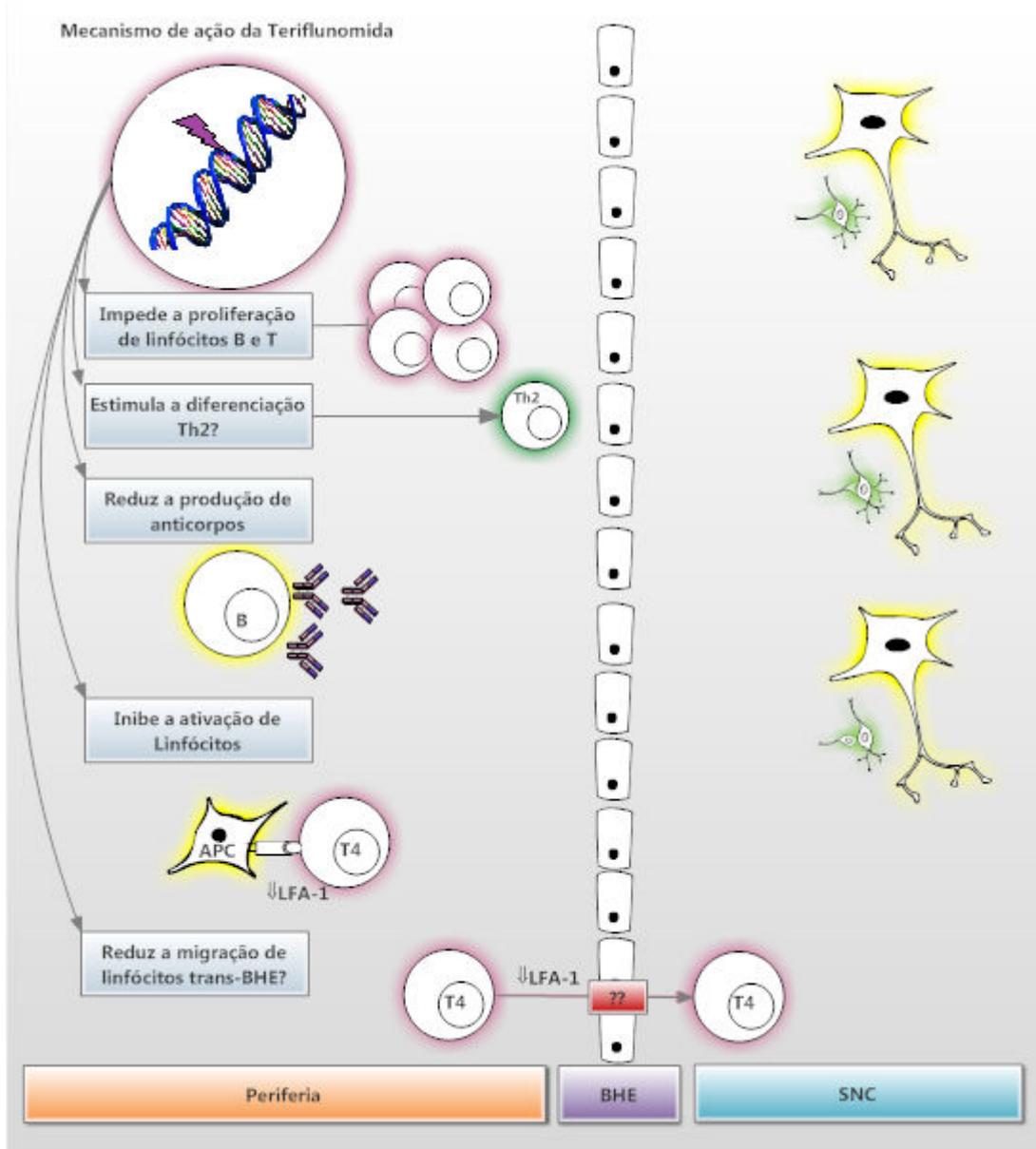


Figura 14. Mecanismo de ação da Teriflunomida

A Teriflunomida é um inibidor do enzima DHODH, essencial à síntese *de novo* das pirimidinas, bloqueando a proliferação de linfócitos B e T. Este fármaco reduz também a síntese de IgM e IgG1. Para além disto, inibe a expressão de LFA-1 reduzindo a ativação de células T e alterando possivelmente a migração trans-BHE destas células.

Fonte: Elaboração própria.

8.6.13 Dalfampridina

A Dalfampridina (4-aminopiridina ou Fampridina de libertação prolongada ou “*sustained release*”) é um fármaco utilizado no tratamento sintomático da EM, mais propriamente na melhoria da marcha. Difere da terapia modificadora de doença, uma vez que tem como objetivo a melhoria funcional, objetivável pelo aumento da velocidade de marcha, não interferindo na redução do número de surtos, ou na atividade imagiológica da doença. (Espejo e Montalban, 2012)

Atendendo a que a incapacidade para a marcha é uma das grandes limitações da EM, a Dalfampridina pode apresentar um impacto significativo na qualidade de vida dos doentes que beneficiam do seu uso. (Ontaneda *et al.*, 2011)

Na realidade, trata-se de um bloqueador seletivo dos canais de potássio, dependentes de voltagem (canais Kv) que exerce o seu efeito na marcha através da otimização da condução nervosa através dos axónios desmielinizados. (Fox, 2010)

De facto, através do bloqueio dos canais Kv expostos nos axónios desmielinizados, a Dalfampridina atrasa a repolarização, aumentando a quantidade de cálcio que entra nos terminais nervosos pré-sinápticos, prolongando desta forma o potencial de ação, maximizando a condução nervosa ao longo das fibras desmielinizadas. (Espejo e Montalban, 2012)

A Dalfampridina bloqueia uma enorme variedade de canais de potássio distribuídos por diferentes tipos celulares, como os neurónios, oligodendrócitos, micróglia e ainda células do sistema imunitário como linfócitos T, B, macrófagos e células dendríticas. (Espejo e Montalban, 2012) Assim para além do efeito induzido na condução nervosa acredita-se que a Dalfampridina também apresente uma atividade imunomoduladora. O bloqueio dos canais de

potássio na micróglia (*in vitro*) associa-se a uma redução da ativação destas células e inibição da produção de citocinas e ROS, prevenindo a neurotoxicidade. (Espejo e Montalban, 2012)

Nos linfócitos TCD4⁺ a Dalfampridina inibe as células T memória através do complexo sinalizador TCR-CD3 e também é capaz de reduzir a secreção de Imunoglobulinas A e G. (Espejo e Montalban, 2012)

Nas células dendríticas, a Dalfampridina reduz a expressão de moléculas co-estimuladoras inibindo a diferenciação T_h1 e a produção de IL-12. A Dalfampridina pode ainda inibir a proliferação macrofágica. (Espejo e Montalban, 2012)

Estudos recentes adiantam que a capacidade de neurorestauração efetivada pela proliferação e diferenciação neuronal de NPCs em oligodendrócitos é inibida pela secreção de vários factores solúveis pelos linfócitos TCD8⁺. A Granzima B (GrB) é o mais importante destes factores. De facto, a neurotoxicidade exercida pela GrB é mediada pela sobre expressão de canais de potássio dependentes de voltagem do tipo Kv1.3. (Wang *et al.*, 2010) O bloqueio destes canais Kv1.3 pela Dalfampridina poderá reduzir a libertação de GrB reduzindo a neuroinflamação e aumentando neurorestauração. (Espejo e Montalban, 2012)

Adicionalmente, o bloqueio Kv1.3 pela Dalfampridina causa uma redução da ativação da micróglia, com prevenção da neurotoxicidade. (Espejo e Montalban, 2012)

Em termos de eficácia, a Dalfampridina, em estudo de fase III (MS-F203 e MS-F204), aumentou a velocidade da marcha em cerca de 25-35% dos doentes com EM. Simultaneamente melhorou outras funções como a acuidade visual (redução de escotomas), função oculomotora (Blight, 2011), função sexual, urinária e intestinal. A Dalfampridina melhorou, ainda, a cognição, a fadiga e espasticidade o que no seu conjunto pode representar um ganho de qualidade de vida. (Espejo e Montalban, 2012)

A Dalfampridina é, na sua generalidade, bem tolerada, contudo acarreta um risco dose-dependente de convulsões. (Espejo e Montalban, 2012)

O mecanismo de ação da Dalfampridina é esquematizado da Fig.15.

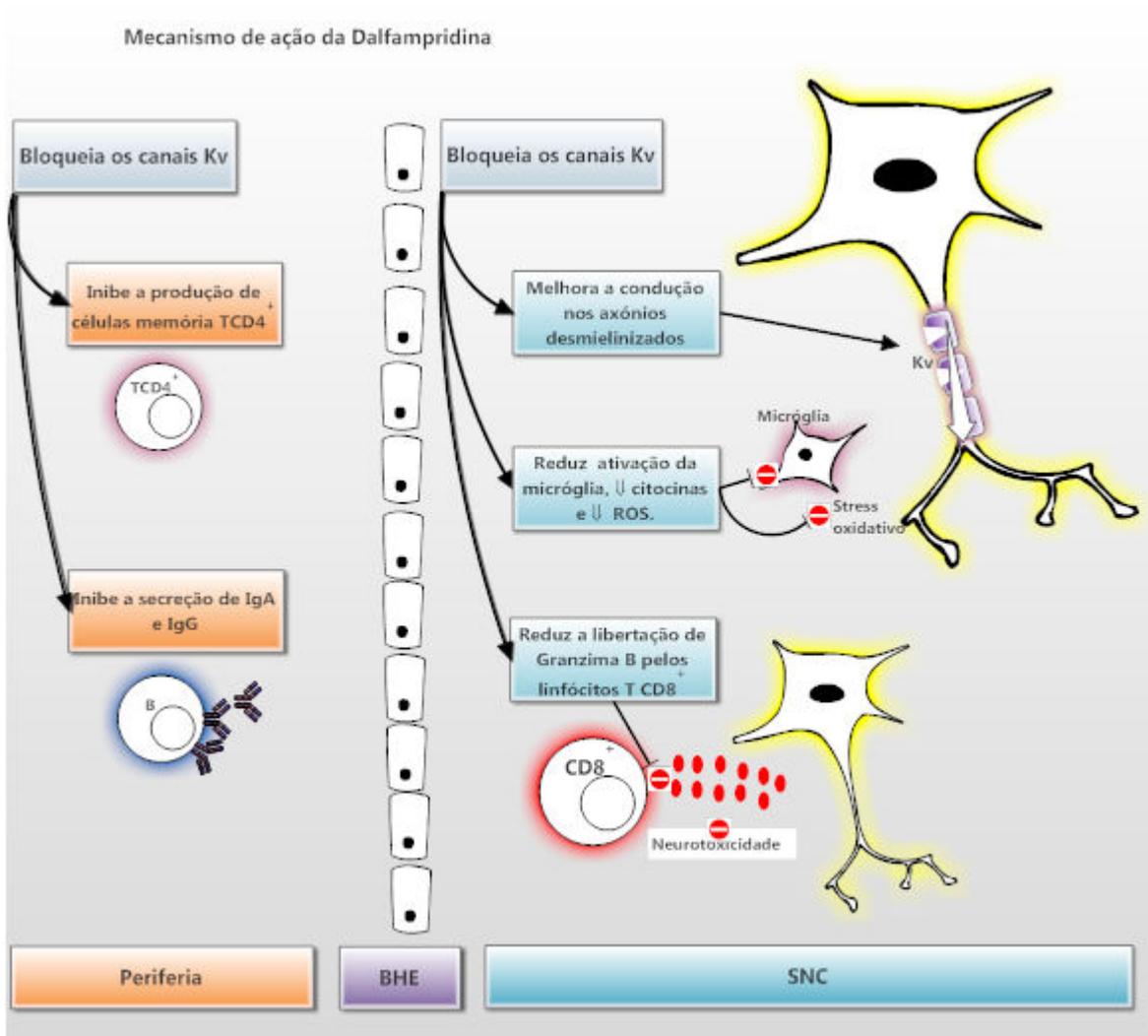


Figura 15. Mecanismo de ação da Dalfampridina.

O bloqueio dos canais Kv exercido pela Dalfampridina melhora a condução nervosa ao longo dos axónios desmielinizados; reduz a ativação de células da micróglia, produção de citocinas e ROS reduzindo a neurotoxicidade. Para além disto, este fármaco reduz a libertação de Granzima B pelos Linfócitos T CD8⁺. O bloqueio de canais Kv nos linfócitos reduz a produção de células memória TCD4⁺ e inibe a secreção de IgA e IgG.

Fonte: Elaboração própria

9. Conclusão

O futuro do tratamento da EM parece auspicioso, ainda que progressivamente mais complexo, dado que à medida que o arsenal terapêutico aumenta, a escolha torna-se mais difícil.

Outrora disponhamos apenas de fármacos de ação anti-inflamatória moderadamente eficazes, mas com bons perfis de segurança ou imunossuppressores inespecíficos com efeitos adversos bastante pronunciados.

Atualmente com o advento de anticorpos monoclonais e de imunomoduladores como o Fingolimod atinge-se uma eficácia sem precedentes, contudo com efeitos secundários potencialmente graves, principalmente no que concerne à utilização de anticorpos monoclonais. Esta condição cria novos desafios ao neurologista e ao doente. Estes terão de encontrar o instável equilíbrio entre a imunossupressão efetiva e o risco de efeitos secundários. A gravidade da doença será, com efeito, o principal factor a ter em consideração.

Nas fases iniciais, a EM comporta-se como uma verdadeira doença inflamatória primária, contudo nas fases progressivas assiste-se a uma neurodegeneração com declínio funcional contínuo independente da atividade inflamatória. Assim distinguem-se duas estratégias terapêuticas que podem ou não ser combinadas. A estratégia imunomoduladora e a estratégia neuroprotetora.

Em termos de imunomodulação, a investigação deverá incidir sobre fármacos que bloqueiem etapas muito específicas e decisivas da fisiopatologia da EM, para que o impacto na imunidade global seja mínimo e máximo na interrupção da cascata patológica da EM. Este objetivo é difícil de atingir devido à complexidade inextrincável do sistema imunitário e ao desconhecimento da totalidade da fisiopatologia da EM.

Provavelmente, o desenvolvimento de uma nova geração de fármacos eficazes no tratamento da EM passará por uma estratégia mais seletiva do que as disponíveis atualmente. Esta seletividade começa a ser “almejada” com o uso de anticorpos monoclonais como o Natalizumab (já aprovado), Rituximab, Alemtuzumab, Daclizumab (em estudo).

Paralelamente, assiste-se a uma investigação bastante intensa na área da neuroproteção/neuroregeneração. De facto, uma abordagem efetiva no tratamento das formas progressivas de EM passaria pelo desenvolvimento de estratégias neuroprotetoras, neurorestauradoras e promotoras da remielinização intrínseca.

Alguns dos fármacos abordados apresentam, efetivamente, capacidades neuroprotetoras, porém residuais, insuficientes para travar a neurodegeneração que se assiste nas fases progressivas da doença. O objetivo incide no desenho de fármacos com mecanismos de ação primariamente neuroprotetores (e.g. estimuladores da diferenciação de oligodendrócitos) de forma a obter resultados clínicos mais evidentes.

É possível que o futuro do tratamento da EM passe pela combinação de fármacos com efeitos imunomoduladores e neuroprotetores. Através destas combinações será possível aliar a alteração da imunidade no sentido de um padrão mais protetor à maximização da capacidade de remielinização intrínseca do SNC. Esta estratégia poderá acarretar um elevado custo económico, que, todavia, poderá ser justificável dado a incapacidade que surge no decurso desta doença.

De facto, para além do aumento da eficácia que se procura nas opções terapêuticas em estudo tem-se assistido a uma aposta crescente nas formulações orais. A qualidade de vida do doente com EM pode ser melhorada com as formulações orais, pois estas permitem regimes

posológicos mais cómodos, conseqüentemente com um aumento da adesão terapêutica e melhores resultados clínicos.

10. Agradecimentos

Agradeço à Dra. Livia Sousa e ao Dr. João Sargento Freitas por todo o apoio e disponibilidade que me concederam durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Dra. Helena Donato pelo auxílio na orientação da pesquisa dos artigos nas diferentes bases de dados.

Agradeço à minha família e ao Carlos pelo apoio e paciência incondicional.

Agradeço à Sara, Daniela e Rita pela partilha dos mesmos anseios e dúvidas ao longo destes meses.

11. Referências bibliográficas

Alcina A *et al.* (2012) Multiple Sclerosis Risk Variant HLA-DRB1*1501 Associates with High Expression of DRB1 Gene in Different Human Populations. *PloS one* 7(1):1-9.

Awad AM *et al.* (2011) Multiple sclerosis and chronic cerebrospinal venous insufficiency: a critical review. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 4: 231-235.

Baleva M, Nikolov K (2011) The Role of Intravenous Immunoglobulin Preparations in the Treatment of Systemic Sclerosis. *International Journal of Rheumatology* 2011:1-4.

Barkhof F *et al.* (2010) Ibudilast in relapsing-remitting multiple sclerosis a neuroprotectant? *Neurology* 74: 1018-1040.

Barten L *et al.* (2010) New approaches in the management of multiple sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy* 4:343–366

Blight AR (2011) *Treatment of walking impairment in multiple sclerosis with Dalfampridine.* *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 4: 99-109.

Boster A *et al.* (2011) Efficacy, safety, and cost-effectiveness of glatiramer acetate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 4: 319-332.

Carpintero R *et al.* (2010) Glatiramer acetate triggers PI3K δ /Akt and MEK/ERK pathways to induce IL-1 receptor antagonist in human monocytes. *PNAS – Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:117692–17697.

Claussen MC, Korn T (2012) Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS – Teriflunomide. *Clinical Immunology* 142:49–56.

Cohen JA, Chun J (2011) Mechanisms of Fingolimod's Efficacy and Adverse Effects in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology* 69:759–777.

Disanto G *et al.* (2011) Vitamin D: a link between Epstein–Barr virus and multiple sclerosis development? *Expert Reviews of Neurotherapeutics* 11(9):1221–1224

Engelhardt B (2008) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood–brain barrier. *Journal of Neural Transmission* 113:477–485.

Ephrem A *et al.* (2008) Expansion of CD4+ CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a Critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 111:715-22.

Espejo C, Montalban X (2012) Dalfampridine in multiple sclerosis: From symptomatic treatment to immunomodulation. *Clinical Immunology* 142:84–89.

Fernández O (2011) Oral laquinimod treatment in multiple sclerosis. *Neurología* 26:111-117.

Foley J (2010) Recommendations for the Selection, Treatment, and Management of Patients utilizing Natalizumab Therapy for Multiple Sclerosis. *The American Journal of Managed Care* 16: 178-183.

Fox EJ (2010) Emerging Oral Agents for Multiple Sclerosis. *American Journal of Managed Care* 16:219-226.

Fox RJ (2010) Primary neuroprotection - The Holy Grail of multiple sclerosis therapy. *Neurology* 74:1018–1019.

Gold SM, Voskuhl RR (2009) Estrogen and Testosterone Therapies in Multiple Sclerosis. *Progress in Brain Research* 175: 239–251.

Gray O, McDonnell GV, Forbes RB (2010) Intravenous immunoglobulins for multiple sclerosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2:1-16

Haile Y *et al.* (2011) Granule-derived granzyme B mediates the vulnerability of human neurons to T cell-induced neurotoxicity. *The Journal of Immunology* 187:Abstract.

Hasseldam H, Johansen FF (2011) Cannabinoid treatment renders neurons less vulnerable than oligodendrocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The International Journal of Neuroscience* 121: Abstract.

Herges K *et al.* (2011) Neuroprotective Effect of Combination Therapy of Glatiramer Acetate and Epigallocatechin-3-Gallate in Neuroinflammation. *PLoS ONE* 6:1-9.

Horga A, Tintoré M (2011) Natalizumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurología* 26:357-368.

Johnson KP (2010) Risk vs benefits if glatiramer acetate: a changing perspective as new therapies emerge for multiple sclerosis. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 6:153–172.

Jones JL, Coles AJ (2010) New treatment strategies in multiple sclerosis. *Experimental Neurology* 225:34–39.

Jorgensen SH, Sorensen PS (2005) Intravenous immunoglobulin treatment of multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of the Neurological Sciences* 233:61 – 65.

Kala M *et al.* (2011) Recent insights into the mechanism of action of glatiramer acetate. *Journal of Neuroimmunology* 235: 9–17.

Kirkwood JM *et al.* (2008) A New Era Approaches: Anti-CTLA-4 Monoclonal Antibodies for the Treatment of Malignant Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 26: 3445-3455.

Krieger S (2011) Multiple sclerosis therapeutic pipeline: opportunities and challenges. *Mount Sinai Journal of Medicine* 78:192–206.

Limmroth V *et al.* (2011) The interferon beta therapies for treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: are they equally efficacious? A comparative review of open-label studies evaluating the efficacy, safety, or dosing of different interferon beta formulations alone or in combination. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 4: 281-296.

Lin S *et al.* (2011) The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1. *American Society for Neurochemistry* 3:75-84.

Linker RA *et al.* (2011) Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* 134:678–692.

Lucchinetti CH (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology* 47: Abstract.

Marriott JJ, O'Connor PW (2010) Emerging Therapies in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Reviews on Recent Clinical Trials* 5:179-188.

Mendes A, Sá MJ (2011) Classical immunomodulatory therapy in multiple sclerosis How it acts, how it works. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 69(3):536-543.

Millonig A *et al.* (2010) Natalizumab treatment reduces endothelial activity in MS patients. *Journal of Neuroimmunology* 227:190–194.

Monson NL *et al.* (2011) Rituximab therapy reduces organ-specific T cell responses and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *PloS ONE* 6:1-6.

Nicholas R *et al.* (2011) Development of oral immunomodulatory agents in the management of multiple sclerosis. *Drug Design, Development and Therapy* 5:255–274.

Ohkuma K. *et al.* (2007) Modulation of dendritic cell development by immunoglobulin G in control subjects and multiple sclerosis patients. *Clinical and Experimental Immunology* 150: 397–406.

Ontaneda D, Hyland M, Cohen JA. (2011) Multiple Sclerosis: New Insights in Pathogenesis and Novel Therapeutics. *Annual Reviews of Medicine*. 63: 5.1-5.16.

Portaccio E (2011) Evidence-based assessment of potential use of fingolimod in treatment of relapsing multiple sclerosis. *Core Evidence* 2011:13–21.

Prat A, Stüve O (2012) Fingolimod - natalizumab in a pill? *The Lancet Neurology* 11 (2): 120-121

Racke M, Lovett-Racke A (2011) Glatiramer Acetate Treatment of Multiple Sclerosis: An Immunological Perspective. *The Journal of Immunology* 186:1887-1890.

Rainer E *et al.* (2010) Multiple Sclerosis - Established and Novel Therapeutic Approaches. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 10:3-15

Sá J (2010) Epidemiology of multiple Sclerosis in Portugal and Spain. *Revista de Neurología* 51:387-92.

Sastre-Garriga J, Montalban X. (2011) Anticuerpos monoclonales en desarrollo en esclerosis múltiple. *Neurología* 26:556-62.

Skarica M *et al.* (2011) Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 235:70–76.

Sobiera DM (2011) Fingolimod: uma potencial terapêutica oral para o tratamento da esclerose múltipla recidivante-remitente e a primeira da sua classe. *Patient Care* 170:11-23.

Sorensen SP (1994) Treatment of multiple sclerosis with IVIg: potential effects and methodology of clinical trials. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 57:62-64.

Stadelmann C (2011) Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Current Opinion in Neurology* 24: 224–22.

Strader C *et al.* (2011) Fingolimod (FTY720): A Recently Approved Multiple Sclerosis Drug Based on a Fungal Secondary Metabolite. *Journal of Natural Products* 74: 900-907.

Thone J, Gold R (2011) Laquinimod: a promising oral medication for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 7:365-370.

Vinod S, Plese SM (2011) Regulation of Suppressors of Cytokine Signaling as a Therapeutic Approach in Autoimmune Diseases, with an Emphasis on Multiple Sclerosis. *Journal of Signal Transduction* 2011: 1-7.

Voort LF *et al.* (2010) Clinical Effect of Neutralizing Antibodies to Interferon Beta That Persist Long After Cessation of Therapy for Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology* 67 4: 402-407.

Wang T. *et al.* (2010) Activated T-Cells Inhibit Neurogenesis by Releasing Granzyme B: Rescue by Kv1.3 Blockers. *The Journal of Neuroscience* 30:5020 –5027.

Warnke C *et al.* (2010) Identification of targets and new developments in the treatment of multiple sclerosis – focus on Cladribine. *Drug Design, Development and Therapy* 2010:4 117–126.

Weber MS, Hohlfeld R, Zamvil SS (2007) Mechanism of Action of Glatiramer Acetate in Treatment of Multiple Sclerosis. *NeuroTherapeutics. The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 4: 647–653.

Wootla B *et al.* (2011) Evidence for the Role of B Cells and Immunoglobulins in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Neurology Research International* 2011:1-14.

Wuest SC *et al.* (2011) A vital role for IL-2 trans-presentation in DC-mediated T cell activation in humans as revealed by daclizumab therapy. *Nature Medicine* 17: 604–609.

Yanping H *et al.* (2009) Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology* 128:260-270.

Yeo TW *et al.* (2007) A Second Major Histocompatibility Complex Susceptibility Locus for Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology* 61:228–236.

Zamboni P *et al.* (2009) Chronic cerebrospinal venous insufficiency in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 80:392-399.

Zangh X *et al.* (2011) Simvastatin inhibits IFN regulatory factor 4 expression and Th17 cell differentiation in CD4+ T cells derived from patients with multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 187:*Abstract*.

Zhang B (2009) Ofatumumab. *mAbs* 1:4: 326-331.