

Milena Sales Pitombeira

Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla: estudo clínico

São Paulo

2022

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Milena Sales Pitombeira

Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla: estudo clínico

**Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

**Programa de Neurologia
Orientadora: Dra. Daniele de Paula Faria**

São Paulo

2022

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pitombeira, Milena Sales
Imagem PET de processos relacionados à esclerose
múltipla : estudo clínico / Milena Sales Pitombeira.
-- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Neurologia.
Orientadora: Daniele de Paula Faria.

Descritores: 1.Esclerose múltipla 2.Tomografia
por emissão de pósitrons 3.Neuroinflamação 4.Micróglia
5.Mielina 6.Incapacidade

USP/FM/DBD-410/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Aos pacientes, aqueles que são o
início, o fim e o meio.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** e ao **Hospital das Clínicas**, pela excelência em assistência e pelas extraordinárias oportunidades de pesquisa.

À **General Eletric**, pelo auxílio financeiro, e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo incentivo contínuo à pesquisa no Brasil.

À toda a equipe do **Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas**, pela maneira profissional e empática com que trataram todos os pacientes. Agradeço especialmente a **Priscila, Rafael e Douglas**, pelo cuidado na aquisição das imagens ao longo de todo o estudo.

À minha orientadora, **Dra. Daniele de Paula Faria**, por me orientar com destreza e por ser exemplo de força, determinação e presença feminina no mundo da pesquisa. Por me guiar por trajetos que eu desconhecia e por me ancorar definitivamente no caminho da boa ciência. Pelo privilégio de ser sua primeira aluna de doutorado, e sobretudo, pelo privilégio da sua amizade.

Ao **Dr. Dagoberto**, toda a minha admiração e gratidão. Poucos são os que tem a chance de serem acolhidos e guiados pela mão de grandes mestres, como eu fui pelo senhor.

Ao **Dr. Michel Kole**, pela parceria e mentoria extraordinárias, por ter me guiado pelos caminhos do PMOD, e por aprimorar o bom humor belga com uma pitada de brasilidade.

Aos **Professores Carlos Buchpiguel e Geraldo Busatto**, pelos valiosos conselhos e por acolherem uma jovem neurologista no universo da Medicina Nuclear e da Neuroimagem.

À **Dra. Samira Apóstolos, Dra. Carolina Rimkus e Dra. Maria Fernanda**, por serem exemplo da força do feminino na Neuroimunologia e por abrirem caminhos e portas para que eu pudesse passar.

Ao **Dr. Fábio Luís de Souza Duran**, do **LIM 21**, pela parceria, auxílio e dedicação nas análises de imagem. Por manter sempre a presteza própria dos compadres.

Aos amigos do **LIM 43 (Carol, Fábio Marques, Mara, Larissa e tantos outros)** pela alegria e apoio diários. Pela convivência em um grupo de pesquisadores ímpar e dedicado. Agradeço em especial, a **Aline Morais**, pela destreza na análise das amostras arteriais.

À **Kenia Campanholo**, minha fantástica companheira de doutorado, pela parceria sólida, pelos conselhos descomplicados, pela resolutividade paulistana e pela empolgação estatística nas disciplinas partilhadas. Que a nossa amizade siga brilhando como o sol nordestino.

Aos amigos que a **Neuroimunologia do HC** me trouxe (**Renata, Bruna, Mateus, Herval, Alexandre, Pedro, Vinícius, Bia, Aline, Laís** e tantos outros), por me acolherem e por me permitirem ser acolhida para vocês em tantos momentos.

Aos amigos do **Instituto do Cérebro de Paris** (**Mariem, Giacomo, Natalia, Theodore, Vito, Emeline e Clement**), pelo ano de crescimento científico excepcional, e pelas memórias criadas. Por me cativarem tão profundamente nesse curto período.

Aos meus **mestres, professores e amigos** da **Universidade Federal do Ceará** e do **Hospital Geral de Fortaleza**, por serem a base para voos mais altos, mas principalmente por sempre me acolherem ao retornar.

Aos meus **amigos do colégio, do teatro, da faculdade e da residência**, por fazerem parte da minha construção, por serem múltiplos e diversos, e por ampliarem a minha visão de mundo.

Por estarem sempre ao meu lado, independente da distância.

Aos meus **tios e primos**, pelo carinho sempre dedicado a mim. Aos **meus sogros e cunhada**, por se unirem a essa rede de afeto de forma tão genuína e forte.

Ao meu irmão, **Vitor**, pelo companheirismo sólido e irrestrito. Espero estar sempre à altura da admiração destinada a mim. Agradeço a você e a **Patrícia**, pela partilha diária do lar e das angústias de pós-graduanda.

Ao meu marido, **Felipe**, por flutuar comigo com leveza e amor nessa jornada. Por me lembrar sempre que a vida é um constructo enorme de pequenos e singelos momentos. Je t'aime!

Aos meus pais, **Lúcia e Pitombeira**, pelo amor imensurável e pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Obrigada por me proporcionarem tantas oportunidades através da educação e por me fazerem acreditar diariamente que o impossível é possível.

A todos os **pacientes e voluntários**, por compartilharem seu tempo, seus medos e suas histórias, o meu mais profundo agradecimento.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS	13
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. <i>OBJETIVO GERAL</i>	21
2.2. <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA E SEUS FENÓTIPOS CLÍNICOS</i>	23
3.2. <i>FISIOPATOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA</i>	27
3.3. <i>INCAPACIDADE FUNCIONAL NA ESCLEROSE MÚLTIPLA</i>	31
3.4. <i>MÉTODOS DE NEUROIMAGEM EM ESCLEROSE MÚLTIPLA.....</i>	33
3.4.1. <i>Imagem de Ressonância Magnética.....</i>	33
3.4.2. <i>Imagem de Tomografia por Emissão de Póstron.....</i>	35
4. MÉTODOS	41
4.1. <i>DESENHO DO ESTUDO E CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL</i>	42
4.1.1. <i>Seleção de pacientes</i>	42
4.1.2. <i>Seleção de controles saudáveis.....</i>	43
4.2. <i>INSTRUMENTOS E PROCEDIMENTOS</i>	44
4.2.1. <i>Avaliação clínica e funcional.....</i>	45
4.2.2. <i>Produção dos radiofármacos.....</i>	48
4.2.3. <i>Aquisição das imagens de PET e RM.....</i>	48
4.2.3.1. <i>Punção, coleta e análise das amostras de sangue arterial</i>	50
4.2.3.2. <i>Processamento das imagens de PET e definição dos volumes de interesse</i>	51
4.2.3.3. <i>Análise e quantificação das imagens de PET com [¹¹C]PK11195.....</i>	54
4.2.3.4. <i>Análise e quantificação das imagens de PET com [¹¹C]PIB</i>	55
4.2.3.5. <i>Análise baseada em voxel (Statistical parametric mapping)</i>	56
4.3. <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</i>	57
5. RESULTADOS	58
5.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DESCRITIVA DA AMOSTRA</i>	60
5.2. <i>CAPTAÇÃO DE [¹¹C]PK11195 E [¹¹C]PIB EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA VERSUS CONTROLES SAUDÁVEIS.....</i>	64
5.3. <i>CAPTAÇÃO DE [¹¹C]PK11195 E [¹¹C]PIB NOS FENÓTIPOS CLÍNICOS DE ESCLEROSE MÚLTIPLA VERSUS CONTROLES SAUDÁVEIS.....</i>	68
5.4. <i>CAPTAÇÃO DE [¹¹C]PK11195 E [¹¹C]PIB DE ACORDO COM EVENTOS CLÍNICOS NA INCLUSÃO E SEGUIMENTO</i>	71
5.4.1. <i>Atividade da doença e comprometimento cognitivo na inclusão</i>	71

5.4.2. Eventos clínicos no seguimento	72
5.5. ASSOCIAÇÃO ENTRE A CAPTAÇÃO DE [¹¹ C]PK11195 E [¹¹ C]PIB E INCAPACIDADE FUNCIONAL	74
5.6. ANÁLISE BASEADA EM VOXEL DOS MAPAS DE [¹¹ C]PK11195 E [¹¹ C]PIB - STATISTICAL PARAMETRIC MAPPING.....	79
5. DISCUSSÃO	82
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	83
5.2. IMAGEM PET DE PROCESSOS PATOLÓGICOS RELACIONADOS À EM	83
5.2.1. Ativação de células da resposta imune inata	84
5.2.2. Conteúdo de mielina	87
6. LIMITAÇÕES	90
7. CONCLUSÃO.....	93
8. PERSPECTIVAS	95
9. REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	109
ANEXO 1 – PUBLICAÇÃO DOS RESULTADOS	110
ANEXO 2 – APROVAÇÃO DA CAPPESQ	113
ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	116
ANEXO 4 – INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO CLÍNICA E FUNCIONAL.....	120
ANEXO 5 – BATERIA NEUROPSICOLÓGICA	124

LISTA DE SIGLAS

9HPT	<i>9 Hole-Peg-Test</i>
BHE	Barreira Hematoencefálica
BOC	Bandas Oligoclonais
BRNB	<i>Brief Repeatable Neuropsychological Battery</i>
CS	Controles Saudáveis
DIT	<i>Dissemination in Time</i>
DIS	<i>Dissemination in Space</i>
DMD	Droga Modificadora de Doença
DTI	<i>Diffusion Tensor Image</i> (Imagem por Tensor de Difusão)
DVR	<i>Distribution Volume Ratio</i> (Razão de Volume de Distribuição)
EAE	Encefalite Autoimune Experimental
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i> (Escala Expandida de Estado de Incapacidade)
EM	Esclerose Múltipla
EMP	Esclerose Múltipla Progressiva
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente
FLAIR	<i>Fluid Attenuation Inversion Recovery</i>
Gd	Gadólínio
HC-FMSUP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HNU	<i>Head Neck Unit</i>
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LGA	<i>Lesion Growth Algorithm</i> (Algoritmo de Crescimento de Lesão)
LST	<i>Lesion Segmentation tool</i> (Ferramenta de Segmentação de Lesão)
MSFC	<i>Multiple Sclerosis Functional Composite</i>
MT	<i>Magnetization Transfer</i> (Transferência de Magnetização)
MTR	<i>Magnetization Transfer Ratio</i> (Razão de Transferência de Magnetização)
NEDA	<i>No Evidence of Disease Activity</i> (Nenhuma Evidência de Atividade de Doença)
OPCs	<i>Oligodendroglial Precursor Cells</i>
PASAT	<i>Paced Auditory Serial Addition Test</i>
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> (Tomografia por Emissão de Póstron)
PIB	<i>Pittsburgh Compound B</i> (Composto B de Pittsburgh)
PIRA	<i>Progression Independent of Relapses</i>
RAW	<i>Relapses Associated Worsening</i>
RM	Ressonância Magnética
SB	Substância Branca

SBAN	Substância Branca de Aparência Normal
SC	Substância Cinzenta
SCAN	Substância Cinzenta de Aparência Normal
SCI	Síndrome Clínica Isolada
SDMT	<i>Symbol Digit Modalities Test</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SPM	<i>Statistical Parametric Mapping</i>
SUV	<i>Standardized Uptake Value</i>
T25FW	<i>Timed 25 Foot Walk</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSPO	<i>18-kDa translocator protein</i>
VIT	Volume Intracraniano Total
VOI	<i>Volumes Of Interest</i> (Volume de Interesse)
V_T	Volume de Distribuição

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exclusões do protocolo de pesquisa.	60
Tabela 2 - Principais características demográficas, clínicas e de ressonância magnética dos participantes do estudo.	63
Tabela 3 - Volumetria baseada na imagem de RM dos participantes do estudo.	64
Tabela 4 - Volume de distribuição (V_T) do [^{11}C]PK11195 e razão do volume de distribuição (DVR) do [^{11}C]PIB em controles saudáveis e pacientes com EM.	66
Tabela 5 - Associações entre volume de distribuição (V_T) do [^{11}C]PK11195 e razão do volume de distribuição (DVR) do [^{11}C]PIB e medidas de incapacidade funcional na EM.	78
Tabela 6 - Resultado da análise paramétrica baseada em voxel dos mapas de [^{11}C]PK11195 (V_T) e [^{11}C]PIB (BPnd): diferenças entre os fenótipos de EM e controles saudáveis.	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fenótipos clínicos representados de acordo com a incapacidade ao longo do tempo.....	26
Figura 2 - Patologia da EM em desenho esquemático e imagem de RM representativa.	29
Figura 3 - Incapacidade funcional medida pela escala EDSS	32
Figura 4 - Desenho esquemático detalhando a aquisição da imagem PET	35
Figura 5 - Alvos potenciais para imagem molecular na EM e marcadores PET correspondentes para ativação microglial e conteúdo de mielina	37
Figura 6 - Fluxograma de atividades nos dias da coleta de dados.....	45
Figura 7 - Estojo do 9 Hole-Peg Test.....	46
Figura 8 - Folha de apresentação do Symbol Digit Modalities Test.....	47
Figura 9 - Coleta de sangue arterial a partir de cateter posicionado na artéria radial...	50
Figura 10 - VOIs sobrepostos à imagem de PET com [¹¹ C]PK11195 e [¹¹ C]PIB	53
Figura 11 - Fluxograma de análise de imagem usando Lesion Segmentation Tool (SPM 8) e o módulo PNEURO (PMOD 4.0).....	54
Figura 12 - Imagem ilustrativa de um tecido de referência extraído utilizando a ferramenta SUPERPIB	56
Figura 13 - Fluxograma do estudo.....	59
Figura 14- Volume de distribuição (V_T) do [¹¹ C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) do [¹¹ C]PIB em pacientes com EM e controles saudáveis.	65
Figura 15 - Correlação entre Volume de distribuição (V_T) de [¹¹ C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de [¹¹ C]PIB nas regiões estudadas.....	67
Figura 16- Volume de distribuição (V_T) do [¹¹ C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) do [¹¹ C]PIB dentre os fenótipos de EM e controles saudáveis. .	69
Figura 17 - Volume de distribuição (V_T) de [¹¹ C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de [¹¹ C]PIB dentre os fenótipos de EM, subdividindo o grupo de pacientes com fenótipo progressivo.....	70
Figura 18- Volume de distribuição (V_T) de [¹¹ C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de [¹¹ C]PIB de acordo com atividade de doença na inclusão.	71
Figura 19 - Razão de volume de distribuição (DVR) de [¹¹ C]PIB e volume de distribuição (V_T) de [¹¹ C]PK11195 e de acordo com comprometimento cognitivo na inclusão	72

Figura 20 - Volume de distribuição (V_T) de [^{11}C]PK11195 de acordo com evento clínico no seguimento.....	73
Figura 21 - Razão do volume de distribuição (DVR) de [^{11}C]PIB de acordo com evento clínico no seguimento.....	74
Figura 22 - Associações entre volume de distribuição (V_T) do [^{11}C]PK11195 e incapacidade funcional medida pela escala EDSS (A-G) e pelo SDMT (H).....	76
Figura 23 - Associações entre razão de volume de distribuição (DVR) do [^{11}C]PIB e incapacidade funcional medida pela escala EDSS (A-C) e pelo SDMT (D).	77
Figura 24 - Análise SPM dos mapas de [^{11}C]PK11195 (V_T) e [^{11}C]PIB (BPnd) entre os fenótipos de EM e controlos saudáveis.....	79
Figura 25- Imagens ilustrativas de PET/RM com [^{11}C] PK11195 e [^{11}C]PIB.	81

RESUMO

Pitombeira, MS. *Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla: estudo clínico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

INTRODUÇÃO: Perfis distintos de neuroinflamação e de conteúdo de mielina são descritos dentre os fenótipos da esclerose múltipla (EM), tanto na substância branca (SB) quanto cinzenta (SC). A imagem de tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, *Positron Emission Tomography* - PET) pode ajudar a desvendar as nuances desses processos patológicos *in vivo* nos diferentes estágios de incapacidade. **OBJETIVO:** Analisar o perfil de ativação microglial e conteúdo de mielina em uma coorte de pacientes com EM e um grupo de controles saudáveis (CS), com ênfase na diferenciação dos fenótipos. **MÉTODO:** Imagens PET utilizando [¹¹C]PK11195 e [¹¹C]PIB (do inglês, *Pittsburgh Compound B*) foram adquiridas em um sistema híbrido de PET e ressonância magnética (RM) 3T, para caracterizar, respectivamente, o perfil de células da resposta imune inata e o conteúdo de mielina em 47 pacientes com EM e 18 CS. Para a análise baseada em volume de interesse (VOI), o volume de distribuição (V_T) do [¹¹C]PK11195 foi determinado usando a função de entrada arterial corrigida para metabólitos, enquanto a razão de volume de distribuição (DVR) do [¹¹C]PIB foi estimada usando uma região de referência individual extraída por um algoritmo específico. Uma análise baseada em voxels também foi realizada usando *Statistical Parametric Mapping*. A incapacidade funcional foi avaliada pela Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), a *Multiple Sclerosis Functional Composite*, e o *Symbol Digit Modality Test* (SDMT). **RESULTADO:** Na análise baseada em VOI, a captação de [¹¹C]PIB (DVR) diferiu entre pacientes e CS no corpo caloso ($P = 0,019$), enquanto não foram observadas diferenças na captação de [¹¹C]PK11195 (V_T). Além disso, não foram observadas correlações ou associações entre os dois traçadores dentro dos VOI analisados. Na análise baseada em voxel, maior captação de [¹¹C]PK11195 foi observada difusamente na SB ao comparar o fenótipo progressivo e CS, e menor captação de [¹¹C]PIB foi observada em certas regiões de SB ao comparar o fenótipo remitente-recorrente e CS. Nenhum dos traçadores foi capaz de diferenciar os fenótipos a nível de voxel ou VOI em nossa coorte. Modelos de regressão linear ajustados para idade, sexo e fenótipo demonstraram que maior incapacidade no EDSS estava associado a uma maior captação de [¹¹C]PK11195 (V_T) e menor captação de [¹¹C]PIB (DVR) no corpo caloso ($P = 0,001$; $P = 0,023$), caudado ($P = 0,015$; $P = 0,008$) e lesão T2 total ($P = 0,007$; $P = 0,012$), enquanto melhor desempenho cognitivo no SDMT foi associado a maior captação de [¹¹C]PIB (DVR) no corpo caloso ($P = 0,001$) e menor captação de [¹¹C]PK11195 (V_T) ($P = 0,013$). **CONCLUSÃO:** Um perfil de ativação difuso de células da resposta imune inata e uma perda acentuada de mielina nas lesões T2 e regiões próximas aos ventrículos foi observada nos pacientes com EM. Esses processos patológicos parecem ocorrer de forma independente, estando ambos associados à maior incapacidade, tanto em estruturas de SB quanto de SC. Nenhum dos traçadores foi capaz de diferenciar os fenótipos de EM a nível de VOI ou voxel em nossa coorte.

Descritores: Esclerose múltipla; Tomografia por emissão de pósitrons; Neuroinflamação; Microglia; Mielina; Incapacidade.

ABSTRACT

Pitombeira MS. *PET imaging of multiple sclerosis-related processes: clinical study* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

INTRODUCTION: Neuropathological studies have demonstrated distinct profiles of neuroinflammation and myelin injury in the white matter (WM) and gray matter (GM) among different multiple sclerosis (MS) phenotypes and disability stages. Positron Emission Tomography (PET) using specific tracers may uncover the *in vivo* molecular pathology and broaden the understanding of the disease heterogeneity. **OBJECTIVE:** To analyze the microglia profile and myelin content using PET imaging in a cohort of patients with multiple sclerosis (relapsing–remitting and progressive phenotypes) and a group healthy control (HC), with an emphasis on differentiating MS phenotypes. **METHOD:** We used the 18-kDa translocator protein (TSPO) tracer [^{11}C]PK11195 and [^{11}C]PIB (Pittsburgh Compound B) PET images acquired in a hybrid PET/MR 3 T system to characterize, respectively, the profile of innate immune cells and myelin content in 47 patients with MS and 18 HC. For the volume of interest (VOI)–based analysis of the dynamic data, [^{11}C]PK11195 distribution volume (V_T) was determined for each subject using a metabolite-corrected arterial plasma input function while [^{11}C]PIB distribution volume ratio (DVR) was estimated using an individual reference region extracted by a supervised clustering algorithm. A voxel-based analysis was also performed using Statistical Parametric Mapping. Functional disability was evaluated by the Expanded Disability Status Scale (EDSS), Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC), and Symbol Digit Modality Test (SDMT). **RESULT:** In the VOI-based analysis, [^{11}C]PIB DVR differed between patients and HC in the corpus callosum ($P=0.019$) while no differences [^{11}C]PK11195 V_T were observed in patients relative to HC. Furthermore, no correlations or associations were observed between both tracers within the VOI analyzed. In the voxel-based analysis, high [^{11}C]PK11195 uptake was observed diffusively in the WM when comparing the progressive phenotype and HC, and lower [^{11}C]PIB uptake was observed in certain WM regions when comparing the relapsing–remitting phenotype and HC. None of the tracers were able to differentiate phenotypes at voxel or VOI level in our cohort. Linear regression models adjusted for age, sex, and phenotype demonstrated that higher EDSS was associated with an increased [^{11}C]PK11195 V_T and lower [^{11}C]PIB DVR in corpus callosum ($P = 0.001$; $P = 0.023$), caudate ($P = 0.015$; $P = 0.008$), and total T2 lesion ($P = 0.007$; $P = 0.012$), while better cognitive scores in SDMT were associated with higher [^{11}C]PIB DVR in the corpus callosum ($P = 0.001$), and lower [^{11}C]PK11195 V_T ($P = 0.013$). **CONCLUSION:** Widespread innate immune cells activated profile and marked loss of myelin in T2 lesions and regions close to the ventricles was observed in patients with MS. These pathological processes seem to occur independently, and are associated with greater disability, both in SB and SC structures. None of the tracers were able to differentiate phenotypes at the voxel or VOI level in our cohort.

Descriptors: Multiple sclerosis; Positron emission tomography; Neuroinflammation; Microglia; Myelin; Disability.

1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é caracterizada por uma patogênese complexa que envolve simultaneamente neuroinflamação, desmielinização e degeneração axonal, sendo esses processos patológicos determinantes para o surgimento de diferentes perfis de incapacidade entre os pacientes que vivem com a EM (1, 2). Os eventos inflamatórios agudos são a marca registrada do fenótipo recorrente-remitente (EMRR) e se manifestam clinicamente através de sintomas neurológicos focais ou surtos. Patologicamente, a lesão clássica da EM caracteriza-se por um processo de desmielinização ativa mediado por células da resposta imune adaptativa. Contudo, evidências robustas demonstram o acúmulo focal de células da resposta imune inata, como a micróglia, que desempenha um papel importante na remoção dos debris de mielina, etapa de apoio ao processo de remielinização em diferentes estágios lesionais (3, 4).

No entanto, diversos padrões de ativação microglial têm sido descritos em estudos neuropatológicos, e muitos destacam uma ativação crônica e difusa das células da resposta imune inata como uma característica em todos os estágios da doença. Mais especificamente, essa ativação crônica, determinando um padrão de inflamação compartimentalizada no SNC, parece contribuir para o acúmulo de incapacidade, especialmente no fenótipo progressivo da EM (EMP) (5, 6). Adicionalmente, a perda do comportamento homeostático da micróglia parece estar associada a atividade de doença, além do potencial impacto na remielinização devido a alteração da interação saudável entre micróglia e oligodendrócitos (7-9).

No tocante ao potencial de remielinização do sistema nervoso central (SNC), diferenças regionais são descritas, potencialmente devido a variabilidade na distribuição anatômica de oligodendrócitos, células precursoras de oligodendrócitos (do inglês, *oligodendroglial precursor cells* – OPCs) e células-tronco neurais (10). Por exemplo, as regiões periventriculares são de maior interesse em relação ao processo de mielinização e remielinização, uma vez que as células-tronco neurais, localizadas principalmente na zona subventricular do ventrículo lateral, têm um maior potencial para estimular a oligodendrogênese, já demonstrado em modelos animais (11, 12). Além disso, uma maior eficiência de remielinização de lesões na substância cinzenta (SC) cortical foi observada quando comparado às lesões de substância branca (SB), e é possível que as diferenças nas subpopulações de OPCs e o perfil microglial nas diferentes regiões anatômicas do SNC tenham papel importante nessa heterogeneidade (13).

Além da variabilidade na capacidade de remielinização, graus distintos de desmielinização são observados nas lesões de SB e SC cortical, onde um padrão menos inflamatório é observado. Essa heterogeneidade também se aplica às regiões de SC profunda dos núcleos da base, que apresentam um fenótipo microglial específico e mostram um padrão intermediário de ativação de células da resposta imune inata (14). Estudos demonstram uma

alta prevalência de lesões na SC profunda desde os estágios iniciais, particularmente no núcleo caudado, o que parece estar associado a maior incapacidade funcional e comprometimento cognitivo nos pacientes com EM. Fatores que tornam a SC profunda um alvo interessante para ampliar o conhecimento sobre o braço neurodegenerativo da patologia (15, 16).

A imagem de ressonância magnética (RM) é convencionalmente utilizada para monitorar a atividade da doença e carga lesional na rotina clínica e no ambiente de pesquisa. Entretanto, a RM convencional é incapaz de avaliar tais processos inflamatórios crônicos associados à imunidade inata, e, apesar dos crescentes avanços nas técnicas de imagem, sua especificidade para determinar o grau de desmielinização em lesões e nos tecidos de aparência normal permanece em debate (17, 18). Os métodos de imagem molecular têm a capacidade de avaliar processos biológicos e patológicos *in vivo*, e podem contribuir para aumentar a nossa compreensão sobre os perfis clínicos dos pacientes com EM.

Diversos estudos utilizando a imagem de tomografia por emissão de pósitrons (do inglês, *Positron Emission Tomography* - PET) buscam abordar esta relação intrincada entre neuroinflamação e neurodegeneração através de traçadores direcionados à proteína translocadora de 18 kDa (TSPO), sabidamente superexpressa na micróglia ativada em modelos animais (19). Estudos em pacientes com EM utilizando a imagem de PET TSPO têm demonstrado diferenças entre os fenótipos EMRR e EMP, colocando essa técnica de imagem como potencial preditor de progressão doença (20-22). Adicionalmente, a imagem PET usando o Composto B de Pittsburgh (do inglês, *Pittsburgh Compound B* - PIB), que se liga à conformação β da proteína básica de mielina de maneira semelhante a qual se liga as placas amiloides extracelulares, tem sido aplicada para avaliar a integridade de mielina, e estudos clínicos demonstraram associações entre mudanças dinâmicas do conteúdo de mielina e incapacidade funcional em pacientes com EM (23-25).

Deste exposto, entender a relação entre neuroinflamação crônica e conteúdo de mielina compreendendo as particularidades anatômicas e individuais é fundamental para ampliar o entendimento sobre o risco de progressão de incapacidade e, em última análise, otimizar o manejo clínico da EM, especialmente nos estágios progressivos da doença. Até o presente estudo, essa relação não havia sido avaliada simultaneamente *in vivo* por meio de imagem molecular e, considerando as mudanças patológicas altamente dinâmicas e as variações interindividuais na EM, uma abordagem combinada tem o potencial de adicionar informações valiosas sobre como esses processos patológicos determinam incapacidade funcional. Parte dos resultados desta tese demonstrando as associações entre imagem PET e medidas de incapacidade já foi publicada, como indicado no **Anexo 1** (26).

2. OBJETIVOS

2.1. *Objetivo geral*

Analisar o perfil de neuroinflamação e conteúdo de mielina utilizando imagens de PET/RM com dois radiofármacos distintos [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB, respectivamente, em uma coorte de pacientes com esclerose múltipla (fenótipos recorrente-remitente e progressivo) e um grupo de controles saudáveis, com ênfase na diferenciação entre os fenótipos.

2.2. *Objetivos específicos*

- ✓ Explorar associações entre o perfil de ativação de células imunes e conteúdo de mielina em pacientes com EM e os dados clínicos e de incapacidade funcional;
- ✓ Diferenciar os processos patológicos predominantes nas lesões presentes na RM e nos tecidos de aparência normal quanto a inflamação e/ou perda de mielina de acordo com os achados das imagens PET;
- ✓ Avaliar a atividade clínica e incapacidade funcional longitudinalmente após doze meses e explorar associações com os dados de imagens de PET/RM.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Caracterização da Esclerose Múltipla e seus fenótipos clínicos

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória crônica mais prevalente do sistema nervoso central (SNC), acometendo cerca de 2 milhões de pessoas no mundo (27). Afeta predominantemente indivíduos jovens e cursa com sintomas neurológicos que podem se manifestar em surtos, no fenótipo recorrente-remitente (EMRR), ou com instalação insidiosa, no fenótipo progressivo (EMP) (1). É uma condição com curso e sintomas bastante heterogêneos, podendo incluir alteração visual, sensitiva, comprometimento motor, distúrbio esfíncteriano, fadiga, dor e déficit cognitivo. A variedade de manifestações clínicas correlaciona-se com a disseminação no tempo e no espaço do acometimento patológico em pontos diferentes do SNC (28).

A EM predomina em regiões de clima temperado e no hemisfério Norte, sendo uma das principais causas de incapacidade em mulheres jovens nessas regiões. É, portanto, uma condição que gera um importante impacto socioeconômico, uma vez que a idade média do início dos sintomas é entre a segunda e terceira décadas, período decisivo para o planejamento familiar e de carreira na vida do indivíduo (29). Apesar do crescente número de opções terapêuticas, a EM ainda é considerada uma doença sem cura, com o potencial de reduzir a sobrevida dos seus portadores e determinar uma mortalidade maior quando comparado à população geral (30).

Na América Latina, os estudos epidemiológicos demonstram frequências de média a baixa e uma prevalência em ascensão. Esse fenômeno parece estar associado a diversos fatores, incluindo o aperfeiçoamento dos critérios diagnósticos ao longo do tempo e a maior disponibilidade de exames de imagem (31). O Brasil segue a mesma tendência do continente, com uma prevalência moderada e em aparente ascensão, como demonstrou Callegaro *et. al* em dois estudos epidemiológicos realizados nos anos 90 na cidade de São Paulo, achado semelhante aos estudos de base populacional da região escandinava (32-34). Apesar da escassez de dados epidemiológicos robustos englobando todo o território nacional, estima-se que a prevalência no Brasil varia entre 12 por 100.000 habitantes (região nordeste) a 27 por 100.000 habitantes (região sul), o que está provavelmente relacionado ao gradiente de colonização europeia com maior predominância de população caucasiana nas regiões sul e sudeste do país (27, 35).

Variações no risco de desenvolver EM observadas em estudos de migração, sugerem que fatores ambientais desempenham um papel importante na patogenia da EM, dentre eles obesidade, exposição solar, status de vitamina D, tabagismo e, reforçado mais fortemente por evidências recentes, a infecção pelo vírus Epstein-Barr (27, 36). Na América Latina, deve-se considerar ainda diferentes fatores ambientais como a exposição às patologias tropicais e a miscigenação genética que parece acarretar diferenças fenotípicas, sendo observado, por exemplo, um perfil mais agressivo da EM na população brasileira afrodescendente (37, 38).

Para estabelecer o diagnóstico de EM, não existe um biomarcador específico, sendo essencial a exclusão de outras doenças neurológicas e a correta aplicação dos critérios clínicos a fim de minimizar o erro (39). Utiliza-se uma série de critérios que se fundamentam no princípio de que lesões afetam o SNC de forma disseminada no tempo (do inglês, *dissemination in time* - DIT) e no espaço (do inglês, *dissemination in space* - DIS), e essa disseminação pode ser evidenciada através da história clínica, exame físico ou exames complementares, sendo a principal ferramenta complementar a imagem de ressonância magnética (RM). O critério atual de McDonald 2017 revisado é útil por duas questões fundamentais: simplifica os achados de RM para estabelecer o diagnóstico e permite que esse seja confirmado no primeiro surto se os critérios de RM e/ou análise de líquido cefalorraquidiano (LCR) forem preenchidos (40, 41).

Para que o diagnóstico de EM seja estabelecido, pelo menos um episódio de surto deve ser corroborado pelo exame neurológico, ou exame complementar, como uma lesão desmielinizante na RM em topografia relacionada à história ou exame físico. O surto é definido por sintomas neurológicos relatados pelo paciente ou sinais observados objetivamente pelo examinador típico de um evento desmielinizante de SNC, atual ou prévio, com duração de pelo menos 24 horas e na ausência de febre ou infecção (40).

Na imagem de RM, caracteriza-se por DIS a presença de uma ou mais lesões nas sequências ponderadas em T2 em pelo menos duas de quatro áreas: região periventricular, justa ou intracortical, infratentorial e medula espinhal. Ressalta-se que as lesões intracorticais, e não somente justacorticais, devem ser avaliadas, uma vez que apresentam alta especificidade para o diagnóstico de EM, recomendação consonante com o consórcio de especialistas no estudo de imagem de RM na EM (do inglês, *Magnetic Resonance Imaging in MS* – MAGNIMS) (42, 43).

A disseminação no tempo (DIT) pode ser caracterizada por uma nova lesão nas sequências ponderadas em T2 ou uma lesão captante de contraste (gadolínio) em RM de seguimento em comparação com exame de base, independentemente do intervalo entre eles. A

presença simultânea de lesões assintomáticas captantes e não-captantes em RM realizada em qualquer momento também preenche critérios de DIT (44). Na revisão de 2017, o painel internacional acrescenta que a presença de bandas oligoclonais (BOC) no LCR é equivalente a DIT e pode ser utilizada para firmar o diagnóstico precocemente (40).

Como citado anteriormente, a EM é uma condição extremamente heterogênea do ponto de vista clínico e, classicamente, a comunidade científica a divide em fenótipos baseados na apresentação dos sintomas neurológicos (41), sendo estes:

- ✓ Síndrome clínica isolada (SCI): definida como o primeiro episódio clínico sugestivo de um quadro inflamatório desmielinizante do SNC. Pode ser a primeira manifestação clínica de EM que, contudo, ainda não preenche os critérios para disseminação no tempo. Cerca de 85% dos pacientes com SCI convertem-se para EM, especialmente aqueles que possuem maior número de lesões na RM inicial (45);
- ✓ EM recorrente remitente (EMRR): corresponde a cerca de 85% dos pacientes portadores de EM e é caracterizada por períodos de surtos, seguido ou não de remissão completa.
- ✓ EM secundariamente progressiva (EMSP): após cerca de dez a quinze anos, cerca de 30% dos pacientes com EMRR evolui para a forma SP, caracterizada por piora lenta e progressiva da incapacidade neurológica não relacionada ao surto ou, muitas vezes, sem a presença evidente de surtos (46);
- ✓ EM primariamente progressiva (EMPP): cerca de 10 a 15% dos pacientes manifestam a forma PP, caracterizada por progressão continuada de incapacidade neurológica desde o início não relacionada à surtos, acometendo indivíduos em torno da quinta década de vida.

A **Figura 1** exemplifica de forma esquemática como o paciente com EM apresenta incapacidade ao longo do tempo a depender do fenótipo clínico.

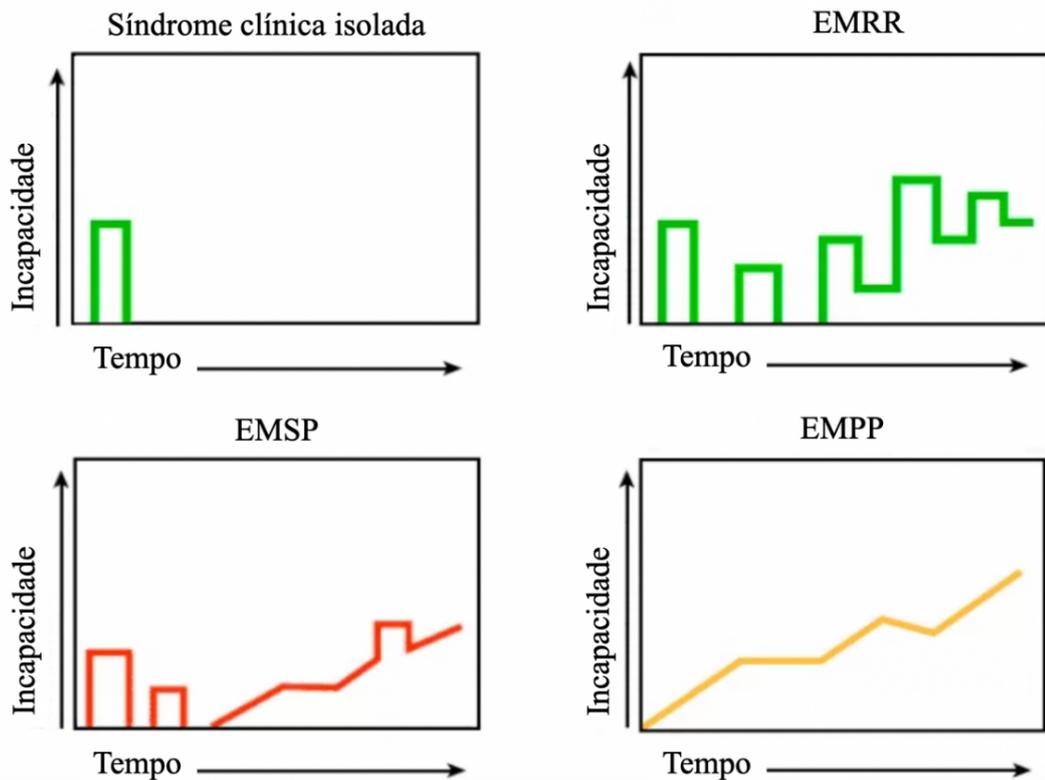


Figura 1 - Fenótipos clínicos representados de acordo com a incapacidade ao longo do tempo.

FONTE: Adaptado de Lublin et al. (47)

SIGLAS: EMRR – Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente; EMSP- Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva; EMPP- Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva.

Em 2013, uma nova classificação fenotípica para EM foi proposta por Lublin et al., baseada em uma revisão da classificação de 1996 realizada pelo mesmo grupo, além de ressaltar a importância de avaliar a presença de atividade e / ou progressão de doença, simplificou a divisão fenotípica em EM recorrente-remitente (EMRR) e EM progressiva (EMP), esta última agrupando os fenótipos EMSP e EMPP (47). A avaliação da atividade de doença é realizada através de critérios clínicos e de imagem, definindo como doença ativa, a presença de surtos clínicos ou novas lesões na RM de encéfalo (considera-se lesões contrastadas; novas lesões T2 ou com aumento inequívoco de volume da lesão no T2). Recomenda-se avaliação periódica de atividade em um prazo médio de 1 ano.

A progressão de doença é definida como piora neurológica ou de incapacidade não relacionada aos surtos, objetivamente confirmada em um período (sugerido 6 a 12 meses de observação). A inclusão da atividade de doença como modificador de fenótipo de evolução clínica, faz com que a divisão em EM primariamente ou secundariamente progressiva seja

suprimida, uma vez que os pacientes passam a ser classificados como EM progressiva ou sem atividade de doença (47).

Essa nova classificação possibilita identificar, independente do fenótipo recorrente ou progressivo, quais os pacientes apresentam atividade clínica e/ou radiológica na RM, bem como progressão da doença. Desta forma, espera-se definir melhor os pacientes respondedores ou não às drogas modificadoras de doença (DMDs), conceito conhecido como “nenhuma evidência de atividade da doença” (do inglês, *No Evidence of Disease Activity* - NEDA) (48). Contudo, o próprio grupo de especialistas ressalta a necessidade de pesquisas e esforços contínuos para melhor definição dos fenótipos, sobretudo no tocante à neuroimagem e biomarcadores. Há ainda a necessidade de melhor caracterização de atividade e progressão de doença dentro de cada fenótipo a fim de identificar com maior precisão os pacientes com potencial de responder às terapias específicas na prática clínica, bem como aumentar a assertividade na seleção de pacientes e nas medidas de desfechos no cenário dos ensaios clínicos randomizados (17, 47, 49).

3.2. Fisiopatologia da Esclerose Múltipla

O conceito atual considera a EM uma condição inflamatória crônica do SNC de mecanismo autoimune e, embora evidências crescentes sugiram uma forte associação entre predisposição genética e fatores ambientais, a exata etiologia da EM não é conhecida (50). De um modo geral, a EM exibe mecanismos inflamatórios e neurodegenerativos que afetam tanto substância branca (SB) quando a substância cinzenta (SC) do encéfalo e da medula espinhal. Em fases iniciais da EM, são observadas placas ativas caracterizadas por lesões desmielinizantes focais com infiltrados inflamatórios perivenulares nas análises histopatológicas, onde predominam células da resposta imune adaptativa, tais como linfócitos T CD4, CD8 e linfócitos B CD20 (51). Essas lesões em placas podem aparecer em todo o SNC, mas são mais facilmente reconhecidas na SB como áreas focais de desmielinização, inflamação e reação glial (1, 28).

O processo inflamatório que consiste em interação e infiltração de células T e B está invariavelmente presente nas lesões do SNC independente do fenótipo clínico (EMRR ou EMP) (50). Classicamente, a EM é considerada um protótipo de doença mediada por linfócitos T, e muito desse conceito é derivado do conhecimento acumulado de modelos animais de encefalite

autoimune experimental (EAE) que se baseiam principalmente na imunização periférica com antígenos do SNC que favorece a ativação de linfócitos T CD4 (52). Além do papel bem estabelecido dos linfócitos T CD4, os linfócitos T CD8 parecem ser determinantes para o dano neuronal uma vez que se acumulam no SNC de pacientes com EM e têm alto potencial citotóxico e inflamatório (53). Ainda sobre o papel da resposta imune adaptativa, repetidas evidências confirmam o papel expressivo dos linfócitos B na patogenia da EM, em especial o sucesso das terapias anti-CD20 (54-56). Agregados de células B nas regiões de leptomeninge são encontrados em todos os fenótipos da doença e parecem contribuir para a compartimentalização do processo inflamatório e por conseguinte para progressão de doença (6, 57).

As células da resposta imune inata, como micróglia, macrófagos, células dendríticas e monócitos circulantes, desempenham um papel determinante nesse processo de inflamação crônico e compartimentalizado. Além da função conhecida de apresentação de antígenos, desempenhada principalmente por macrófagos e células dendríticas, as células da resposta imune inata têm papéis dinâmicos e dependentes do estágio da doença e da localização anatômica. Especialmente a micróglia residente no SNC, apresenta um amplo espectro de funções, que variam desde fagocitose de detritos, relevante para fase de remielinização, até um estado pró-inflamatório quiescente e patogênico (58, 59). Mensurar a ativação microglial e o perfil predominante em cada paciente permanece um desafio até o presente momento. Além da ausência de biomarcadores específicos e não-invasivos, mesmo em estudos anatomopatológicos decorrentes de biópsias de tecido cerebral, o padrão morfológico sozinho não é totalmente capaz de diferenciar o perfil de ativação sendo necessária em geral uma análise transcricional mais aprofundada. Estudos recentes sugerem que a mudança de comportamento da micróglia pró-inflamatória para um estado regenerativo pode auxiliar no processo de remielinização, tornando a modulação da micróglia um alvo terapêutico interessante (13).

O processo de desmielinização intenso que se segue ao processo inflamatório mediado por células T e a intensa ativação microglial, gera estresse oxidativo crônico, podendo levar à dano mitocondrial e acúmulo de ferro, com consequente neurodegeneração e perda axonal (57, 60). Estudos patológicos em biópsias e autópsias indicam que os estágios iniciais da desmielinização são heterogêneos e evoluem ao longo de semanas a meses. Independentemente do padrão imunológico específico de desmielinização precoce, a análise das lesões ativas ao longo do tempo e do espaço sugere que um mecanismo imune predomina em cada fenótipo e

que, provavelmente, difere dentre os indivíduos do mesmo fenótipo, determinado por um perfil de resposta imune único (2, 61).

Lesões desmielinizadas em regiões do córtex cerebral também são encontradas nas análises patológicas, sendo fortemente sugestivas de EM desde estágios iniciais da doença (62). As lesões corticais podem ser divididas em 3 subtipos principais: cortico-subcortical, intracortical e subpial, sendo esta última a mais frequentemente observada nos pacientes com EM. Em associação com as lesões corticais subpiaais, um acúmulo de células T e B pode ser observado nas meninges e especula-se que esses agrupados linfoides contribuem de forma significativa para o dano cortical precoce e contínuo na EM (63). Além disso, lesões em região de SC profunda também são observadas, contribuindo para uma mudança de conceito definitiva sobre a patogenia da EM que deve ser entendida como um processo de neuroinflamação e degeneração envolvendo todo o SNC, incluindo a SC cortical e profunda, e não só a SB (57, 63, 64).

A **Figura 2** exemplifica o acometimento difuso da SB e SC cortical e profunda em um estudo pós-morte de paciente com EM (A e B), seguida de uma imagem representativa de RM exemplificando as lesões típicas na sequência FLAIR. Note que a RM convencional tem a capacidade de detectar claramente as lesões desmielinizantes focais em SB (no esquema patológico em verde), mas é menos sensível em detectar as lesões de SC cortical e profunda (em laranja e azul, respectivamente), bem como os focos difusos de células da resposta imune inata (pontos em preto).

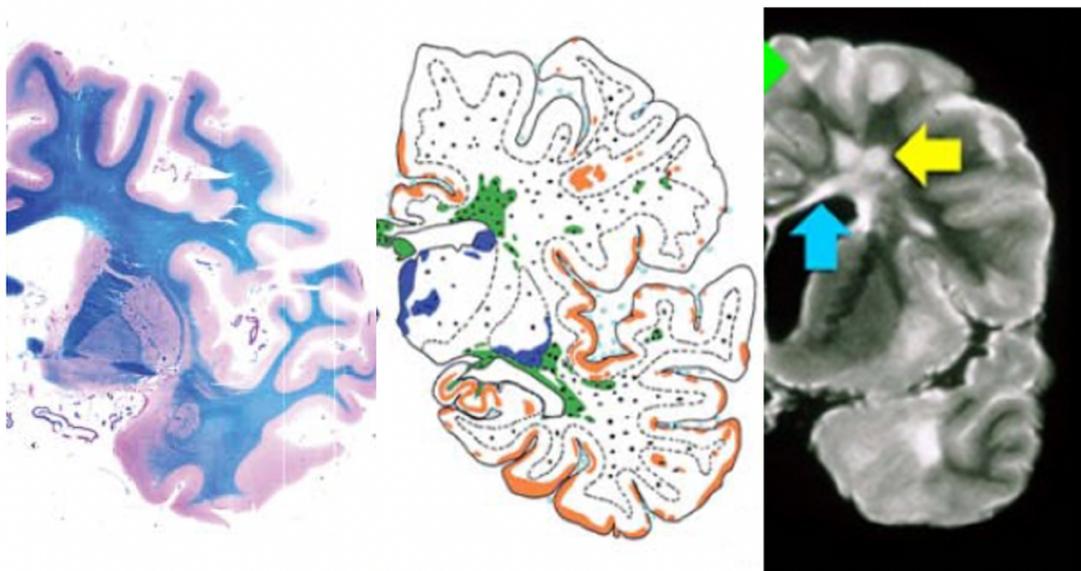


Figura 2 - Patologia da EM em desenho esquemático e imagem de RM representativa.

À esquerda, um corte histológico coronal do cérebro de um paciente com EM. No centro um desenho esquemático demonstrando os focos de desmielinização em SB (em verde), SC cortical (em laranja) e SC profunda (em azul); os pontos em preto representam focos de inflamação difusamente distribuídos no parênquima cerebral. À direita, uma imagem representativa de RM demonstrando as lesões de SB visíveis ao método na região justacortical (seta verde) e periventricular (setas azul e amarela).

FONTE: Adaptado de Kutzelnigg et al. (6)

SIGLAS: EM – Esclerose Múltipla; RM – Ressonância Magnética; SB – Substância Branca; SC – Substância Cinzenta.

No tocante a tradução radiológica do observado na patologia, o comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE), detectado na imagem de RM através de lesões com realce pelo agente de contraste paramagnético (Gd), serve como um marcador de atividade da doença na rotina clínica. De forma indireta, os infiltrados inflamatórios perivascularares podem ser inferidos utilizando-se sequências específicas de susceptibilidade magnética para visualizar o “sinal da veia central”, observado na maioria das lesões com hipersinal T2 dos pacientes com EM (65), bem como os anéis de ferro (do inglês, *iron rim*) decorrentes do depósito desse metal em células microgliais na borda de lesões crônicas ativas (66, 67). É importante pontuar que a imagem de RM convencional não é capaz de mensurar o acometimento dos tecidos de aparência normal, como a SB e a SC de aparência normal (SBAN e SCAN, respectivamente), que por definição compreende os tecidos a parte das lesões visualizadas nas sequências de imagem de RM ponderadas em T2. E, embora a imagem de RM possa identificar com alguma especificidade o depósito de ferro na micróglia perilesional, ela é basicamente insensível aos focos de ativação microglial difusos na SBAN e SCAN.

No tocante aos fenótipos, embora a quebra da BHE seja mais evidente nos pacientes com EMRR, nenhum desses achados radiológicos descritos acima é capaz de diferenciar os fenótipos entre si, pois se sobrepõe em ambos os grupos, variando em grau e intensidade e dependem do tempo de doença. Adicionalmente, a avaliação do dano axonal difuso e do conteúdo de mielina nas lesões e no tecido de aparência normal permanece um desafio, uma vez que a maioria dos estudos emprega a imagem por tensor de difusão (do inglês, *diffusion tensor imaging* - DTI) ou a transferência de magnetização (do inglês, *magnetization transfer* - MT), com protocolos de aquisição e processamento variáveis, o que dificulta a reprodutibilidade (68-74). Por fim, a atrofia pode ser mensurada na imagem convencional e é considerada uma medida de dano axonal, contudo entende-se que a atrofia é um desfecho tardio,

sendo necessárias mais ferramentas para medir o processo neurodegenerativo contínuo que antecede a redução do volume das estruturas cerebrais (48, 75).

3.3. Incapacidade funcional na Esclerose Múltipla

A EM representa uma importante causa de incapacidade funcional em adultos jovens, estando associada a uma redução de 7 a 14 anos na expectativa de vida e a um aumento da mortalidade de cerca de três vezes, quando comparados com a população geral (76). A apresentação clínica sintomatológica da EM é heterogênea, sendo os sintomas mais comuns o déficit motor ou sensitivo em um ou mais membros, disartria, ataxia, vertigem, neurite óptica, neuralgia trigeminal, intolerância ao calor, fadiga, dor, alterações cognitivas e depressão (1). De modo geral, um paciente com EM pode acumular incapacidade através de surtos repetidos da doença, com recuperação incompleta e sintomas residuais. Nesse cenário, os esforços primordiais se voltam a tratar os surtos de forma efetiva e determinar uma DMD que diminua a chance de novos eventos e assim o acúmulo de deficiências com impacto no dia a dia.

Contudo, os pacientes com EM podem também apresentar um acúmulo paulatino de incapacidade independente da presença de surtos. Esse fenômeno há muito conhecido da comunidade científica, através do fenótipo progressivo da doença, seja EMPP ou EMSP (47). Embora conhecido, é um fenômeno difícil de mensurar, pois se apoia no uso de ferramentas clínicas mais subjetivas e é por vezes difícil de ser reportado pelo próprio paciente e familiares uma vez que, diferentemente do surto que ocorre de forma aguda, a progressão é classicamente insidiosa e lenta levando muitas vezes a um viés de percepção (77, 78). Nesse cenário, em vigência de um estudo clínico que se proponha a avaliar progressão, é necessário ampliar ao máximo os âmbitos funcionais avaliados, bem como definir critérios do que será considerado progressão, piora ou flutuação da incapacidade (79-81).

Classicamente a incapacidade funcional na EM é medida através da escala de incapacidade expandida de Kurtzle (do inglês, *Expanded Disability Status Scale - EDSS*), que com base em um exame neurológico direcionado, divide e pontua os sistemas funcionais de acordo com o grau de severidade do acometimento. A escala EDSS varia de 0 a 10, sendo 0 sem alterações perceptíveis ao exame neurológico e 10 morte associada à EM (82). Os estudos de história natural e coortes mais clássicas ressaltam 2 pontos de corte importantes na escala EDSS, sendo a pontuação 3 (moderada incapacidade) e a pontuação 6 (necessidade de apoio unilateral para deambular) universalmente aceitas como degraus críticos na evolução de um

paciente com EM (46, 83). A **Figura 3** demonstra os níveis de incapacidade medidos pelo EDSS.

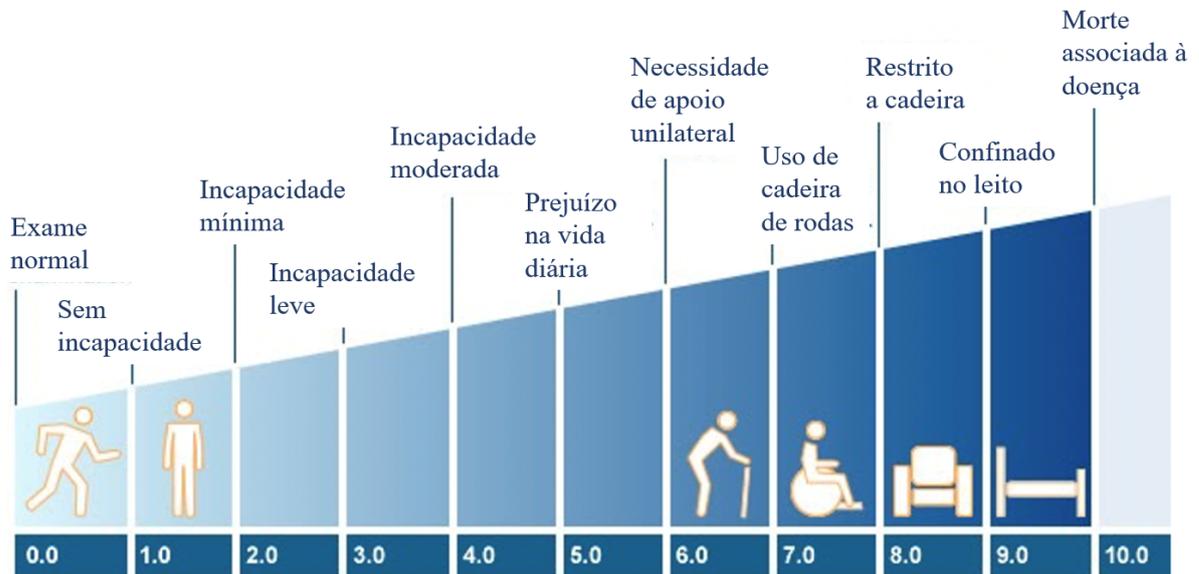


Figura 3 - Incapacidade funcional medida pela escala EDSS.

FONTE: Adaptado de Kurtzle et al. (82)

SIGLAS: EDSS - *Expanded Disability Status Scale*.

Por ser a escala mais tradicional, o EDSS é amplamente utilizado em estudos e ensaios clínicos com medida de desfecho. Contudo, nos últimos anos, muitos questionamentos surgiram a respeito da capacidade do EDSS de mensurar de forma acurada e ampla a incapacidade funcional, uma vez que é uma escala muito focada na função motora de membros inferiores e deambulação. Vale ressaltar que a discussão sobre as medidas de incapacidade e avaliação de progressão e piora na EM, tem se tornado ainda mais imperativa, uma vez que nos últimos anos, passou-se a ter terapias com a proposta de retardar o avanço da doença em pacientes com EMP (55, 84). A saber, o fenótipo progressivo não dispunha de nenhuma alternativa de terapia específica até recentemente, ficando reservados aos pacientes com EMRR a totalidade dos tratamentos aprovados em ensaios clínicos com ação no braço inflamatório da patologia (85). Nesse cenário, o debate sobre avaliação correta da incapacidade se faz extremamente importante, tanto para identificar corretamente os pacientes que se beneficiariam de tais terapias, quanto para mensurar a resposta ou não ao tratamento, o que teria impacto direto nos riscos e no custo do plano terapêutico.

Adicionalmente, com a ampliação do entendimento a respeito das alterações cognitivas precoces e presentes na EM, tornou-se mais premente a inclusão de outros métodos de avaliação

funcional (81, 86). Nesse contexto, a escala MSFC (do inglês, *Multiple Sclerosis Functional Composite*) foi proposta como métrica adjuvante, uma vez que avalia velocidade motora de membros superiores, além da velocidade de deambulação, e soma ainda uma medida de avaliação cognitiva, o *Paced Auditory Serial Addition Test* (PASAT) (87, 88). Além do PASAT, outro teste consagrado para avaliar velocidade de processamento, é o *Symbol Digit Modalities Test* (SDMT) que vem sendo amplamente utilizado pela facilidade de aplicação e interpretação (89). Uma vez que o PASAT sofre impacto da escolaridade e pode ser uma tarefa estressora, o SDMT é fácil e rápido e pode ser aplicado pela equipe multidisciplinar, sendo uma ferramenta atraente para o rastreo de declínio cognitivo na população com EM.

Por fim, nos últimos anos, uma discussão sobre progressão silenciosa mesmo nos pacientes com fenótipo EMRR tem sido debatida e o conceito de progressão independente de surto (do inglês, *progression independent of relapses* – PIRA) tem se superposto ao conceito de piora associada ao surto (do inglês, *relapse associated worsening* – RAW), como principal causa de acúmulo de incapacidade nos pacientes com EM em todos os fenótipos (90, 91). Evidências de grandes bancos de dados provenientes de ensaios clínicos randomizados, sugerem que em se utilizando ferramentas clínicas mais acuradas, a maioria dos pacientes com EM piora da incapacidade mesmo na ausência de evento clínico focal bem definido ou sem atividade radiológica classicamente medida pela RM (92). Essas observações levantam questionamentos importantes sobre as ferramentas de avaliação, tanto clínicas quando radiológicas atuais, e apontam a necessidade de se buscar novos biomarcadores de imagem que possam ampliar a nossa compreensão sobre como o paciente com EM adquire incapacidade ao longo da vida.

3.4. Métodos de neuroimagem em Esclerose Múltipla

3.4.1. Imagem de Ressonância Magnética

Atualmente, a imagem de ressonância magnética (RM) desempenha um papel bem definido no diagnóstico e acompanhamento de eficácia e segurança do tratamento dos pacientes com EM. Além do monitoramento na rotina clínica, a RM convencional, incluindo imagens ponderadas em T2, T1 e pós-gadolinio, figura entre os principais desfechos de ensaios clínicos nas últimas duas décadas (43, 44). Considerando que a atividade de RM é muito mais frequente que a atividade clínica, o monitoramento por RM é comumente somado a avaliação neurológica no desenho dos estudos. Isso tem grande impacto nos ensaios clínicos randomizados para novas

DMDs, uma vez que utilizar a imagem de RM como desfecho primário, pode vir a reduzir o número de pacientes recrutados, a duração do estudo e, conseqüentemente, o custo total (93).

Um ponto sensível e de constante debate é a incapacidade da RM de detectar completamente o processo fisiopatológico subjacente às alterações de imagem. Uma vez que a RM demonstra primariamente alterações do conteúdo de água nos tecidos, o que ocorre tanto no processo inflamatório, quanto em processos de desmielinização ou remielinização, torna-se um desafio determinar qual deles predomina em cada lesão pela imagem convencional. As lesões da EM, caracteristicamente com hipersinal nas imagens ponderadas em T2, podem refletir diferentes estados histopatológicos das placas como, por exemplo, uma "placa sombra" (do inglês, *shadow plaque*) desmielinizada ou uma lesão completamente remielinizada. Entretanto, a alteração do conteúdo de mielina a qualquer tempo no decorrer da doença já pode alterar a intensidade de sinal na RM e as técnicas de imagem convencionais não são capazes de definir a extensão do processo de remielinização ou remielinização a nível lesional. Além das limitações na caracterização do estado inflamatório e de conteúdo de mielina das lesões evidentes na SB, a RM convencional também se mostra insuficiente para avaliar o grau de comprometimento na SB de aparência normal (SBAN) e na substância cinzenta (SC) cortical, sabidamente afetadas pela doença nos estudos patológicos (94).

Ademais, o desenvolvimento de drogas neuroprotetoras e que induzam remielinização é dificultado pela falta de métodos capazes de quantificar adequadamente o conteúdo e/ou integridade de mielina usando uma abordagem reprodutível em todo o mundo. Essa questão é extremamente relevante no contexto das alterações neurodegenerativas na EMP, onde é ainda mais difícil mensurar a resposta terapêutica devido à menor frequência de atividade da doença nos estudos por RM convencional (95). Uma vez que na doença progressiva a presença de quebra de BHE com lesões captantes de Gd ou mesmo o surgimento de novas lesões na imagem ponderada em T2 é menos comum, as atenções se voltam a medidas de atrofia global ou segmentar, como em região de córtex, tálamo ou medula cervical para avaliar progressão (75, 96, 97). Contudo, o processo de atrofia tem relação direta com o grau de degeneração axonal e é possível que essa seja uma medida tardia do processo neurodegenerativo, e talvez um ponto em que a intervenção terapêutica pode não ser tão eficaz. Portanto, biomarcadores de imagem alternativos se fazem necessários especialmente nessa população.

Diversas técnicas complexas de RM têm sido exploradas e incorporadas em ensaios clínicos como desfechos secundários a fim de melhor avaliar os processos patológicos subjacentes. A imagem por tensor de difusão, do inglês *Diffusion Tensor Imaging* (DTI), e a

taxa de transferência de magnetização, do inglês *Magnetization Transfer Ratio* (MTR), por exemplo, são utilizadas para abordar de forma mais específica e quantitativa os tecidos mielinizados, na tentativa de detectar pontos de alteração no conteúdo e/ou integridade da mielina que podem ser mais sensíveis para prever incapacidade a longo prazo (68, 98-100). Contudo, mesmo essas técnicas avançadas apresentam, por vezes, correlações insatisfatórias nas análises histopatológicas e não há até o momento consenso sobre utilizá-las em contextos clínicos.

3.4.2. Imagem de Tomografia por Emissão de Póstron

A imagem molecular, em particular a tomografia por emissão de póstron (do inglês, *Positron Emission Tomography* - PET), é uma ferramenta não invasiva capaz de gerar uma imagem funcional com alta sensibilidade e boa resolução, fornecendo informações quantitativas sobre processos fisiológicos e bioquímicos *in vivo* sem interferir no sistema estudado diretamente. A especificidade da imagem PET para cada tecido está diretamente relacionada à natureza do traçador utilizado. Para tal, é injetado um radiofármaco capaz de emitir póstrons que ao encontrar elétrons presentes no tecido sofrem um fenômeno conhecido como aniquilação, emitindo dois raios gama de 511 keV de energia em sentidos opostos que, por sua vez, são detectados pelo anel (360°) de detectores do equipamento PET. A imagem tridimensional é então reconstruída computacionalmente (**Figura 4**).

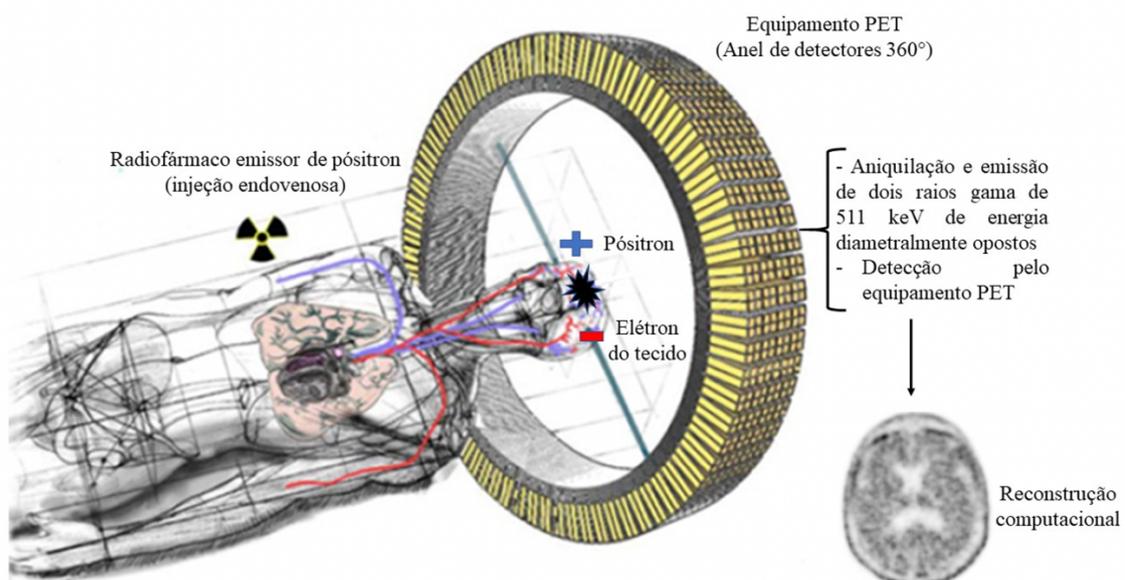


Figura 4 - Desenho esquemático detalhando a aquisição da imagem PET.

FONTE: adaptado de Turkheimer et al. (101)

SIGLAS: PET - *Positron Emission Tomography*.

A aquisição da imagem PET é classicamente antecedida a uma imagem de tomografia computadorizada (TC) como base anatômica para correção de atenuação dos tecidos, contudo a imagem de TC não é suficientemente sensível ou específica para a maior parte das patologias neurológicas e diversos estudos nesse cenário somam a imagem de PET/TC a uma imagem de RM adquiridas em tempos diferentes. Na última década, uma atenção crescente foi dedicada à imagem multimodal e equipamentos integrados de PET e RM com aquisição simultânea têm sido explorados em diversos campos. Os sistemas híbridos de PET/RM têm a vantagem de avaliar a estrutura cerebral, metabolismo, perfusão e atividade neuronal simultaneamente, ou seja, nas mesmas condições fisiológicas e, portanto, ampliar a percepção dos processos patológicos considerando o seu dinamismo.

No contexto da EM, faz-se ainda mais interessante o uso de ferramentas com o potencial de avaliar diversos processos patológicos *in vivo* e de forma simultânea dada a complexidade da condição e o difícil acesso a material histopatológico. Considerando tratar-se de uma condição predominante em pacientes jovens e os riscos inerentes à biópsia cerebral, grande parte do conhecimento patológico acumulado advindo de estudos histológicos é decorrente de análises *post-mortem*, onde predominam casos com tempo prolongado de doença, ou biópsias de casos de EM com comportamento pseudotumoral, que corresponde a uma minoria da população. Diversos estudos têm demonstrado resultados promissores no tocante à utilização da imagem PET no contexto da EM, destacando o seu potencial na prática clínica dentro da perspectiva da medicina personalizada (102-104). De fato, a EM é uma doença complexa e diversos processos patológicos podem ser alvo de avaliação por imagem molecular com o intuito de ampliar o entendimento da heterogeneidade desses fenômenos em diferentes fenótipos e fases da doença (**Figura 5**) (105).

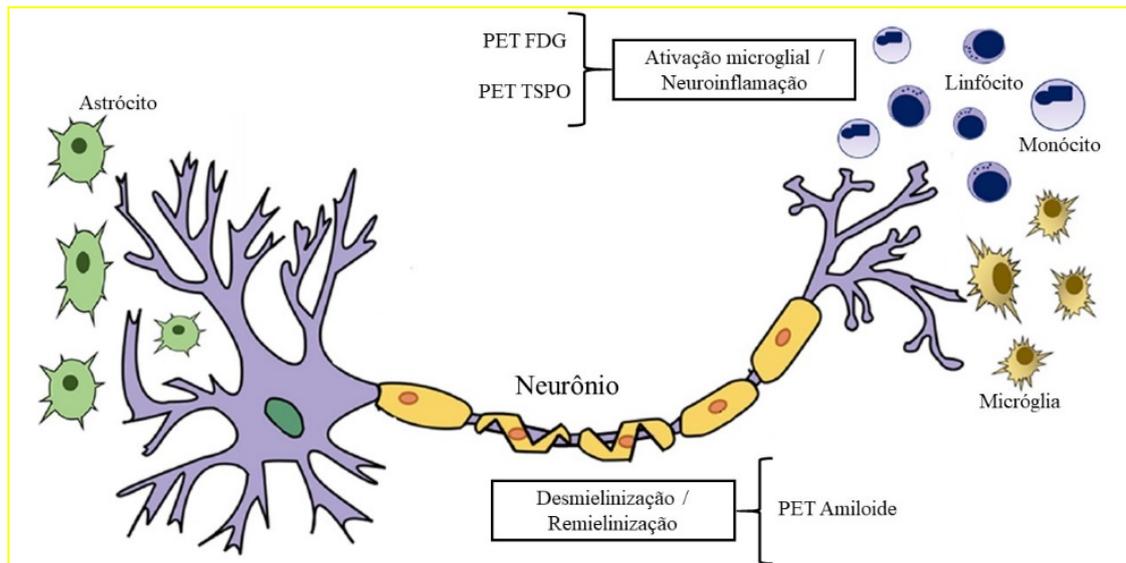


Figura 5 - Alvos potenciais para imagem molecular na EM e marcadores PET correspondentes para ativação microglial e conteúdo de mielina.

FONTE: adaptado de Bauckneht et al. (105).

SIGLAS: EM – Esclerose Múltipla; PET - *Positron Emission Tomography*; FDG – Fluordeoxiglicose; TSPO - *18kDa translocator protein*.

Dentre os processos patológicos presentes na EM a neuroinflamação é o mais estudado e abordado do ponto de vista terapêutico. Existem mais de quinze drogas modificadoras de doença (DMDs) aprovadas até hoje e, apesar dos diferentes mecanismos de ação, quase a totalidade dessas drogas agem prioritariamente no componente inflamatório mediado pela resposta imune adaptativa, reduzindo o número de surtos e a formação de novas lesões (40). Vale ressaltar que o conceito de detecção de inflamação utilizados nos ensaios clínicos randomizados dessas medicações é baseado essencialmente nas imagens de RM que, como discutido anteriormente, se baseia no surgimento de novas lesões nas imagens ponderadas em T2 ou lesões captantes de contraste. Essa abordagem deixa duas questões fundamentais em aberto: 1) a identificação dos pacientes com EMP com maior probabilidade de responder a imunoterapias; 2) biomarcadores adequados para dar suporte ao desenvolvimento de tratamentos neuroprotetores e neurorregeneradores.

A proteína translocadora de 18 kDa, também conhecida como TSPO (do inglês, *18kDa translocator protein*), foi identificada como um dos alvos de imagem PET mais promissores para mensurar neuroinflamação em diversas patologias (101, 106). A proteína TSPO não funciona necessariamente como um "receptor" no sentido convencional, mas participa do processo de permeabilidade da membrana mitocondrial, estando minimamente expressa de forma ubíqua no cérebro humano saudável associado a vários processos fisiológicos. Quando

super expressa coincide seletivamente com a ativação das células da resposta imune inata em modelos animais o que determinou uma série de investimentos em traçadores TSPO para estudo de neuroinflamação, contudo ainda é uma questão de debate se a observação feita em modelos animais pode ser completamente transposta para o cérebro humano (105, 107, 108). Ademais, estudos em modelos animais sugerem que essa ativação microglial é predominantemente pró-inflamatória (do tipo M1), no entanto, as implicações práticas desse achado em humanos ainda não são claras, pois a existência dos estados M1 e M2 (anti-inflamatório) de ativação microglial no processo patológico em humanos é mais complexo e provavelmente está dentro de um espectro rapidamente mutável e que transita entre esses dois polos (59, 109).

A primeira visualização *in vivo* da expressão de TSPO foi realizada através de imagem de PET utilizando o radiofármaco [^{11}C]PK11195, um traçador de primeira geração derivado de isoquinolina carboxamida [^{11}C]N-butan-2-il-1-(2-clorofenil)-N-metilisoquinolina-3-carboxamida. O uso do [^{11}C]PK11195 apresenta alguns desafios, dentre eles, a necessidade de um ciclotron *in-house*, devido à marcação com o radioisótopo carbono-11 (^{11}C) de meia-vida ultra curta (20,4 min), e a impossibilidade de determinar um tecido de referência para quantificação das imagens, uma vez que TSPO é expresso em todo o cérebro (101, 110). O tecido de referência é uma região onde não há captação específica do radiofármaco e a ligação inespecífica é semelhante à das regiões de interesse, além disso a captação no tecido de referência não deve ser afetada pelo processo patológico, sendo necessários estudos *ex vivo* para validação do mesmo. No contexto da EM sabe-se que o processo inflamatório compromete virtualmente todo o SNC dificultando essa determinação. Na ausência de um tecido de referência, o valor de captação padronizado, do inglês *Standardized Uptake Value* (SUV), comumente utilizado na prática clínica para avaliação de imagem PET, não reflete diretamente a ligação específica do radiofármaco, sendo necessária a aplicação de um modelo farmacocinético levando em consideração a função de entrada arterial e a metabolização deste radiofármaco, o que demanda a coleta de amostras de sangue arterial durante a aquisição da imagem (101, 111).

Diversos estudos destacam a utilidade potencial da imagem PET com traçadores TSPO, como [^{11}C]PK11195, [^{11}C]PBR28 e [^{18}F]GE-180, no campo da EM para acessar de forma não invasiva a heterogeneidade neuropatológica em lesões T2 de SB e em SC cortical, sendo, por exemplo, capaz de detectar áreas de ativação focal de macrófagos/micróglia em pacientes com EMRR em lesões com e sem captação de contraste na RM (112). Mesmo em fases precoces da doença, já é possível detectar maior neuroinflamação em regiões de SBAN e SC profunda de

núcleos da base em pacientes com SCI (113). Além de diferenças à nível de lesão e região encefálica, foram observados padrões distintos entre os fenótipos, como um aumento mais pronunciado da captação em região cortical e na SBAN da região perilesional em pacientes com EMP, possibilitando a observação *in vivo* de lesões latentes ou crônicas ativas, do inglês *smoldering lesions*, há muito, bem descritas nos estudos patológicos (1, 22, 114).

Recentemente, foi demonstrado um aumento da expressão celular de TSPO, sítio de ligação específica do [¹¹C]PK11195, em cerca de 20 vezes nas lesões ativas e na borda das lesões crônicas ativas, em relação à SBAN, em um estudo imunopatológico em seções de tecido de pacientes com EM. Nessa análise, a expressão de TSPO foi uniforme entre as células e não se mostrou preferencialmente associada a micróglia pró-inflamatória. Essas observações estabelecem uma estrutura quantitativa para a interpretação do PET TSPO, contudo destacam a necessidade de uma melhor caracterização neuropatológica da expressão do TSPO na fisiopatologia da EM (107). É válido ressaltar que diversos estudos com PET TSPO demonstram correlação direta entre maior ativação microglial em diferentes regiões e contextos à incapacidade funcional, bem como redução da captação após tratamento, o que sugere uma relação entre neuroinflamação, seja ela causa ou epifenômeno, com o status funcional e resposta terapêutica na EM, corroborando fortemente a possibilidade de se utilizar a imagem molecular para neuroinflamação como ferramenta preditora de incapacidade (107, 113, 115, 116).

Por sua vez, uma medida acurada *in vivo* do conteúdo de mielina é essencial para aprofundar o conhecimento dos mecanismos subjacentes as lesões desmielinizantes e para avaliar os efeitos de tratamentos remielinizantes emergentes. Uma ferramenta com aplicação crescente nos estudos de pacientes com EM é o uso da imagem PET com marcadores amiloides para avaliação da SB, uma vez que se ligam homoganeamente a esta, independentemente da presença de placas beta-amiloide na SC cortical adjacente. O mecanismo dessa ligação é pouco conhecido, contudo acredita-se que os traçadores amiloides têm afinidade pela estrutura conformacional beta da proteína básica de mielina, que é semelhante à do peptídeo amiloide (117).

O composto B de Pittsburgh (do inglês, *Pittsburgh Compound B* - PIB) foi o primeiro marcador amiloide utilizado para demonstrar lesões desmielinizadas no cérebro de pacientes com EM em análise pós-morte (23). O radiofármaco [¹¹C]PIB, utilizado em humanos desde 2004 para identificação de placas beta-amiloides no córtex cerebral de pacientes com Doença de Alzheimer, vem sendo empregado para avaliar o conteúdo de mielina em pacientes com EM, sendo capaz de demonstrar uma redução progressiva de captação da SBAN da periferia

para o centro das lesões, refletindo um gradiente de redução de mielina. Além disso, a avaliação longitudinal com PET [¹¹C]PIB foi capaz de estabelecer perfis de remielinização individuais que se correlacionaram com medidas de incapacidade funcional (24). Adicionalmente, foi demonstrado por Carvalho *et. al* em modelo de EAE para EMP em primata não-humano, a capacidade do PET [¹¹C]PIB de evidenciar alteração do conteúdo de mielina tanto em SB quanto SC cortical e profunda, ampliando mais ainda o potencial desse traçador na EM (102).

Observou-se ainda em uma coorte de pacientes com EM dita tardia utilizando PET [¹¹C]PIB uma correlação entre pior desempenho cognitivo e menor captação em regiões de SBAN e lesões de SB, contudo sem captação aumentada em região cortical por depósito amiloides, sugerindo uma correlação entre conteúdo de mielina e desempenho das funções mentais superiores. O mesmo grupo correlacionou posteriormente a imagem de DTI com o PET e os dados sugerem que o PET [¹¹C]PIB é capaz de mensurar as alterações no conteúdo de mielina que precedem o declínio cognitivo na EM (25, 118)

Em suma, identificar os processos patológicos predominantes em cada paciente através da imagem molecular *in vivo* pode auxiliar na predição da evolução clínica nos diferentes fenótipos da EM e, conseqüentemente, definir terapias individualizadas em consonância com o conceito de medicina personalizada. A imagem PET pode contribuir no futuro próximo para preencher a lacuna entre a neuroimagem convencional e a neuropatologia da EM, além de presumivelmente auxiliar no desenvolvimento de soluções terapêuticas inovadoras. Adicionalmente, o potencial de combinar dados de PET com os achados de RM, utilizando um sistema híbrido de PET/RM, capaz de definir diferentes características da doença de forma não invasiva e simultânea, amplia a exequibilidade e reprodutibilidade das linhas de pesquisa nesse cenário.

4. MÉTODOS

Este estudo é resultado do projeto “Imagem PET de processos relacionados à esclerose múltipla: estudo clínico” aprovado pela Comissão de Ética para análise de Projetos de Pesquisa-CAPPesq (número do parecer 2.451.027 – **Anexo 2**). Todos os participantes leram, compreenderam e concordaram em participar da pesquisa, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 3**). O estudo foi conduzido segundo os preceitos da Declaração de Helsinque, respeitadas as Normas de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Res. CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde.

4.1. Desenho do estudo e cálculo do tamanho amostral

Este foi um estudo observacional prospectivo de análise transversal por imagem multimodal, seguido de uma etapa longitudinal de reavaliação clínica e funcional após 12 meses da imagem. O cálculo do tamanho amostral foi realizado com base nos estudos em modelos animais de encefalite autoimune experimental (EAE) em ratos que precederam este estudo clínico (104). Para tal, foi considerado o valor de captação basal de [¹¹C]PK11195 na imagem de PET no momento prévio à indução da EAE, sendo o SUV de aproximadamente 0,3, e o maior valor de SUV após a indução da EAE, este de aproximadamente 0,5. Utilizando análise de variância (ANOVA) para comparação dos grupos e considerando a maior variabilidade de SUV obtida entre os animais, no caso 0,15 (desvio padrão), a amostra necessária para a realização do estudo, com poder de 80% e confiança de 95%, seria de cinco pessoas em cada grupo. Prevendo uma maior variabilidade e complexidade da doença em seres humanos quando comparados ao modelo animal de EAE, foi estimado um número de 15 indivíduos em cada grupo.

4.1.1. Seleção de pacientes

Os pacientes foram selecionados a partir do ambulatório de esclerose múltipla do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pela médica neurologista especialista em Neuroimunologia e pesquisadora executante do projeto (M.S.P.), com apoio da equipe de neurologistas do serviço.

Os critérios de inclusão foram:

- ✓ Idade de 18 a 65 anos;
- ✓ Escolaridade igual ou maior que 4 anos;

- ✓ Diagnóstico de EM confirmado pelos critérios de McDonald revisados de 2017(40);
- ✓ Ser regularmente acompanhado no ambulatório do HC-FMUSP;
- ✓ Concordar em participar da pesquisa e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – **Anexo 3**).

Os critérios de exclusão foram:

- ✓ Contraindicação à realização de RM: claustrofobia, marca-passo, estimuladores cerebrais profundos, prótese metálica, etc.;
- ✓ Gravidez e amamentação;
- ✓ Limitações que não os permitissem permanecer no aparelho de PET/RM por cerca de 70 minutos: tremor, rigidez/espasticidade, distúrbio psiquiátrico, etc.;
- ✓ Limitações que não permitissem a punção arterial e venosa em membros superiores: espasticidade, deformidade, tremor, etc.;
- ✓ Uso de corticoide oral ou endovenoso nos 30 dias antecedentes à realização dos exames de imagem e à avaliação neuropsicológica;
- ✓ Uso de benzodiazepínicos nas últimas 4 semanas ou com diagnóstico atual de quadro psiquiátrico sem tratamento;
- ✓ Condição clínica grave, tais como insuficiência renal, cardíaca, hepática ou disfunção metabólica grave, que limite a punção e/ou a persistência longa para realização de exames.

4.1.2. *Seleção de controles saudáveis*

Os controles saudáveis foram recrutados a partir de convite e voluntariado de sujeitos da comunidade.

Os critérios de inclusão foram:

- ✓ Idade, sexo e escolaridade controlados a partir da casuística de pacientes;
- ✓ Concordar em participar da pesquisa e assinar o TCLE.

Os critérios de exclusão foram:

- ✓ Apresentar história prévia e atual de qualquer doença do SNC;
- ✓ Limitação física ou sensorial que impeça de realizar a aplicação das escalas funcionais e testes cognitivos;
- ✓ Contraindicação à realização de RM: claustrofobia, marca-passo, estimuladores cerebrais profundos, prótese metálica, etc.;
- ✓ Gravidez e amamentação;

- ✓ Limitações que não os permitissem permanecer no aparelho de PET/RM por cerca de 70 minutos: tremor, rigidez/espasticidade, distúrbio psiquiátrico, etc.;
- ✓ Limitações que não permitissem a punção arterial e venosa em membros superiores: espasticidade, deformidade, tremor, etc.;
- ✓ Uso de corticoide oral ou endovenoso nos 30 dias antecedentes à realização dos exames de imagem e à avaliação neuropsicológica;
- ✓ Uso de benzodiazepínicos nas últimas 4 semanas ou com diagnóstico atual de quadro psiquiátrico sem tratamento;
- ✓ Condição clínica grave, tais como insuficiência renal, cardíaca, hepática ou disfunção metabólica grave, que limite a punção e/ou a persistência longa para realização de exames.

4.2. Instrumentos e procedimentos

Os participantes foram convidados para fazer parte do protocolo de pesquisa durante consulta clínica regular no ambulatório de Neuroimunologia do HC-FMUSP, quando pacientes, ou durante convivência em comunidade, quando controles. Após apresentação verbal do protocolo de pesquisa a ser realizado, o voluntário foi convidado a ler e assinar o TCLE (**Anexo 3**), em que deu sua anuência para uso dos dados coletados em publicações científicas.

De acordo com cronograma, disponibilidade do voluntário e do aparelho de PET/RM, foi agendada uma data para avaliação e aquisição das imagens. Na data agendada, o voluntário submeteu-se à avaliação clínica neurológica, avaliação neuropsicológica e aos procedimentos de imagem. O fluxo processual ocorreu conforme esquema da **Figura 6**.

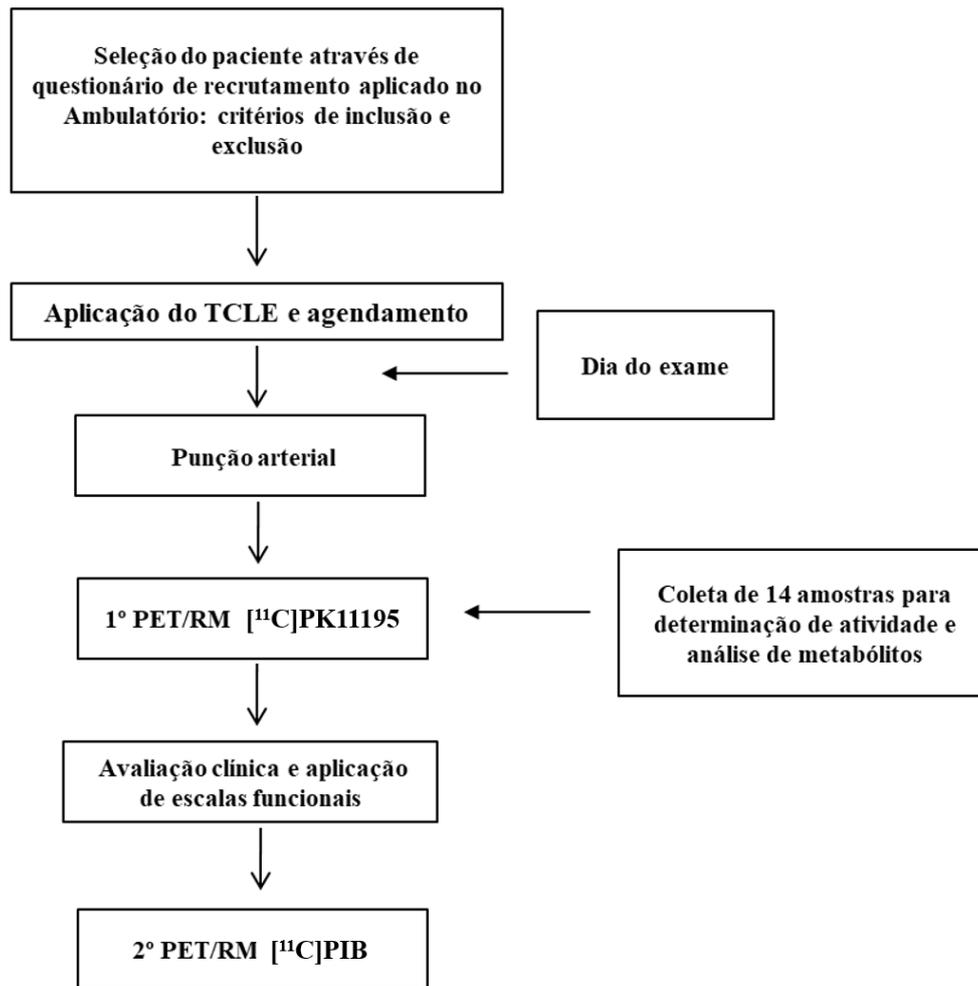


Figura 6 - Fluxograma de atividades nos dias da coleta de dados.

SIGLAS: TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido; PET- *Positron Emission Tomography*; RM- Ressonância Magnética; PIB - *Pittsburgh Compound B*.

4.2.1. Avaliação clínica e funcional

Os participantes foram submetidos a uma avaliação clínica e funcional detalhada, executada preferencialmente no dia da aquisição dos exames de imagem e realizada pela pesquisadora executante e neurologista especialista em neuroimunologia e por neuropsicóloga com experiência em doenças desmielinizantes. A avaliação incluiu:

Dados sociodemográficos e avaliação de comorbidades, adicionalmente histórico detalhado de atividade de doença, progressão, surtos e tratamento foi coletado dos pacientes incluídos (**Anexo 4**). Classificação dos grupos fenotípicos, bem como a avaliação de atividade e progressão de doença, definida de acordo com os critérios de Lublin et. al (47). Os pacientes foram categorizados em esclerose múltipla fenótipo recorrente-remitente (EMRR) e esclerose

múltipla fenótipo progressivo (EMP), englobando os fenótipos primariamente progressivo e secundariamente progressivo.

- ✓ Avaliação de incapacidade funcional através da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (do inglês, *Expanded Disability Status Scale* - EDSS) (82), que avalia as funções neurológicas a partir de oito sistemas funcionais.

Uma medida ampliada de funcionalidade foi realizada utilizando o instrumento *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) (87). Os testes que compõe a MSFC são:

- ✓ *9 Hole-peg test* (9HPT) – é um teste de velocidade psicomotora. A partir de um estojo com 9 orifícios (**Figura 7**), o participante deve completá-los com 9 pinos de encaixe perfeito, e, então, retirá-los do encaixe e devolvê-los ao estojo. É solicitada a execução deste processo por duas vezes com mão dominante e duas com mão não dominante, é cronometrado o tempo de execução de cada tentativa.



Figura 7 - Estojo do 9 *Hole-Peg Test*.

- ✓ *Timed 25-Foot walk* (T25FW) – é um teste de velocidade motora de membros inferiores. Sobre uma pista com 7,62 metros demarcada no chão, o participante é solicitado a caminhar o mais rápido possível por duas vezes. É cronometrado o tempo de execução de cada caminhada.
- ✓ *Paced Auditory Serial Addition Test* (PASAT) - é um teste de memória operacional. A partir de uma gravação sonora, são apresentados 61 números, de 1 a 9, sendo um número a cada 3 segundos. O participante deve somar os valores ditos em sequência, de modo que cada novo número é somado ao número apresentado por último, nunca sendo somado com o resultado da conta anterior.

Adicionalmente, uma avaliação neuropsicológica utilizando a *Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests* (BRB-N) (119, 120) foi realizada como parte de uma pesquisa

derivada deste projeto original (**Anexo 5**). Desta avaliação mais ampla o seguinte teste foi analisado como medida cognitiva além do PASAT:

- ✓ *Symbol Digit Modalities Test* (SDMT) (89) – versão oral – é um teste de velocidade de processamento e atenção. Em uma chave, há 9 símbolos correspondentes aos dígitos de 1 a 9 (**Figura 8**). Abaixo da chave, são apresentados, de forma aleatória, os mesmos 9 símbolos; o participante deve dizer, em 90 segundos, o máximo de números correspondentes aos símbolos apresentados.

KEY								
┌	>	┐	└	+	┌)	÷	⊂
1	2	3	4	5	6	7	8	9

⊂	┐	└	⊂	┌	>	└	┌	⊂	>	└	⊂	>	⊂	└
┌	>	⊂	└	┐	>	┌	┌	⊂	└	>	÷	┌	┌)
┌	┐	+)	⊂	┌	+	┌)	┐	└	÷	┌	┌	+
└	┌	┐	⊂	>	┌	⊂	┐	>	+	÷)	┌	>	┌

Figura 8 - Folha de apresentação do *Symbol Digit Modalities Test*.

Todos os participantes foram submetidos a avaliação de imagem multimodal e avaliação clínica no momento da inclusão e convidados para uma reavaliação clínica e funcional após 12 meses. A taxa anualizada de surtos (TAS) foi definida na inclusão considerando o número total de surtos e o tempo de doença em anos e o paciente foi considerado como tendo doença ativa se presença de surtos no ano anterior à inclusão ou ocorrência de lesão com captação de contraste na RM do estudo. A progressão foi definida na avaliação de 12 meses quando observada qualquer das situações a seguir, na ausência de surtos (79, 86):

- ✓ Aumento de $\geq 1,0$ ponto na escala *EDSS*, se pontuação inicial $< 5,5$;
- ✓ Aumento de $\geq 0,5$ ponto na escala *EDSS* se pontuação inicial $\geq 5,5$;
- ✓ Aumento de 20% no tempo para execução do teste de caminhada de 25 pés (*T25FW*)
- ✓ Aumento de 20% no tempo para execução do teste de 9 pinos (*9HPT*)

A pontuação dos testes PASAT e SDMT foram convertidas em *z-score* ajustados para idade e escolaridade. Os pacientes com *z-score* $< -1,5$ em ambos os testes foram considerados com comprometimento cognitivo na inclusão (119). Uma mudança no escore bruto de 4 pontos no SDMT ou uma mudança de 0,5 desvio padrão (DP) no PASAT foram consideradas

mudanças significativas na reavaliação após 12 meses (89). A presença de surtos ou progressão na reavaliação foram agrupados e considerados eventos clinicamente significativos para a análise. Todos os testes de avaliação funcional foram aplicados em todos os participantes, nas mesmas condições e pelos mesmos avaliadores experientes (M.S.P. e K.R.C) no decorrer do estudo.

4.2.2. *Produção dos radiofármacos*

Os radiofármacos, [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB, foram produzidos em um ciclotron vertical da GE (PET-Trace 880, Uppsala, Suécia) localizado no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HC-FMUSP, utilizando um módulo de síntese ModularLab da Eckert & Ziegler (Berlin, Alemanha). Controle de qualidade físico-químico e biológico foram realizados para cada lote produzido, seguindo os procedimentos já estabelecidos e validados na instituição.

4.2.3. *Aquisição das imagens de PET e RM*

As imagens foram adquiridas no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HC-FMUSP em um equipamento híbrido de PET/RM 3 T (SIGNA, GE Healthcare) com resolução espacial de aproximadamente 4,0 mm no centro do campo de visão. Para cada participante, o radiofármaco [^{11}C]PK11195, um traçador TSPO de primeira geração, foi usado para avaliar a ativação de células da resposta imune inata, enquanto o radiofármaco [^{11}C]PIB foi usado para avaliar o conteúdo de mielina. Os dois exames de PET/RM foram realizados preferencialmente no mesmo dia, sendo o limite máximo de intervalo entre eles de 15 dias e mínimo de 4 a 5 horas, para devido decaimento radioativo. Ambos os exames de PET foram adquiridos de forma dinâmica com duração de 60 minutos.

Antes do início do exame de PET com o [^{11}C]PK11195, uma punção arterial foi realizada pela médica e pesquisadora executante (M.S.P) para coleta de sangue arterial. A aquisição começou simultaneamente à uma injeção intravenosa em bolus do radiofármaco administrada em 1 min (dose média \pm DP de $337,3 \pm 24,2$ MBq em pacientes vs $334,4 \pm 12,6$ MBq em controles, $P = 0,6$ pelo teste t não-pareado). Durante a aquisição dinâmica de 60 minutos, 14 amostras de sangue arterial foram coletadas manualmente para determinação da atividade plasmática e análise de metabólitos, conforme detalhado abaixo.

A imagem de PET com [^{11}C]PIB foi igualmente iniciada simultaneamente à injeção intravenosa em bolus do radiofármaco administrada em 1 min (dose média \pm SD de $339,4 \pm 57,2$ MBq em pacientes vs $341,8 \pm 24,6$ MBq nos controles, $P = 0,9$ pelo teste de Mann-Whitney) e adquirida de forma dinâmica durante 60 minutos.

Ambas as imagens PET foram reconstruídas usando o algoritmo 3D *Ordered Subset Expectation Maximization* (2 iterações e 28 subconjuntos) com informações de tempo de voo (do inglês, *time-of-flight*), seguido de correção de atenuação baseado em um atlas GE (método padrão atual no sistema SIGNA PET/MR) (121). Vinte e um timeframes (6×10 s, 2×30 s, 3×1 min, 2×2 min, 2×3 min, 3×5 min, 3×10 min) foram reconstruídos e então suavizados com um filtro gaussiano de 3 mm.

As imagens de RM foram realizadas concomitantes à aquisição das imagens de PET, à exceção das sequências contrastadas, para que o Gd não viesse a interferir nas imagens dinâmicas do PET. Sequências de RM ponderadas em T1 e T2, incluindo o FLAIR (do inglês, *Fluid Attenuation Inversion Recovery*) foram adquiridas em sagital 3D volumétrico utilizando uma bobina de 24 canais (do inglês, *Head Neck Unit - HNU*). As sequências de RM foram adquiridas com os seguintes parâmetros:

- ✓ Imagem ponderada em T1 (tempo de repetição = 7,6 ms, tempo de eco = 3,1 ms, tempo de inversão = 600 ms, ângulo de inversão = 8° , espessura do corte = 1 mm);
- ✓ Imagem ponderado em T2 imagem (tempo de repetição = 2500 ms, tempo de eco = 87 ms, comprimento do trem de eco = 120, ângulo de inversão = 90° , espessura do corte = 1 mm);
- ✓ Imagem T2 FLAIR (tempo de repetição = 6500 ms, tempo de eco = 140 ms, comprimento do trem de eco = 220, ângulo de inversão = 90° , espessura do corte = 1,3 mm).

As imagens ponderadas em T1 e FLAIR foram adquiridas pré e pós-injeção de gadolínio (Gd) (0,05–0,1 mmol/kg) para avaliação de lesões com realce pelo meio de contraste por um neurorradiologista experiente (C. M. R.).

Todas as imagens dos participantes foram anonimizadas e identificadas por número de protocolo referente à entrada no estudo (P01 a P75), e mantidas em computador com senha acessível somente aos pesquisadores diretamente envolvidos no estudo, preservando o sigilo durante as análises. As imagens de PET e RM foram analisadas usando o *software* PMOD versão 4.0 e 4.1 (PMOD Technologies Ltd., Zurique, Suíça) e *Statistical Parametric Mapping* (SPM 8 e 12; <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>).

4.2.3.1. Punção, coleta e análise das amostras de sangue arterial

Prévia a realização da punção arterial, os participantes foram avaliados quanto à circulação colateral adequada da mão através do teste de Allen a fim de evitar complicações relacionadas ao procedimento (122). Após assepsia e anestesia local, um cateter foi posicionado na artéria radial e um conector valvulado acoplado (**Figura 9**) a fim de permitir a coleta de amostras de sangue arterial durante a imagem dinâmica de PET/RM com [^{11}C]PK11195 (123). Após o término do exame, o acesso arterial foi removido para adequada avaliação clínica e funcional do participante.



Figura 9 - Coleta de sangue arterial a partir de cateter posicionado na artéria radial.

Durante a aquisição da imagem dinâmica com [^{11}C]PK11195, 14 amostras de sangue arterial foram coletadas para determinação da atividade plasmática e análise de metabólitos, sendo a primeira coleta no tempo zero (início do exame) e a última coleta no minuto 60 após a injeção do radiofármaco, seguindo a seguinte sequência: 1 segundo, 10 segundos, 30 segundos, 45 segundos, 60 segundos, 90 segundos, 2 minutos, 3 minutos, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos e 60 minutos. Onze das quatorze amostras foram de 2 ml para determinação da atividade plasmática e três amostras maiores (20, 45 e 60 minutos), de 5 ml,

para quantificação de metabólitos, as quais foram realizadas por um profissional químico treinado nesta técnica (A.M.S).

As amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 3500 G para separação do plasma. Ao plasma centrifugado, foram adicionados 2 ml de acetonitrila para precipitação de proteínas. Após rápida agitação manual, a mistura foi centrifugada por 1 minuto a 3500 G. O sobrenadante foi filtrado com filtro Millex PVDF 0,45µm e reservado para utilização posterior. Aproximadamente 4 ml do plasma preparado foi então injetado em um sistema HPLC (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) 1260 Infinity II LC (Agilent, Califórnia, EUA) utilizando fase móvel etanol/água 60/40% e coluna de cromatografia C18 Luna® (5 µm 250 x 4,6 mm, Phenomenex). As corridas tiveram duração de 22 minutos, com fluxo de 2,5 ml/min. Um detector BGO (do inglês, *Bismuth Germanium Oxide*, E&Z, Berlin, Alemanha) acoplado ao HPLC foi utilizado para determinação do sinal radioativo das amostras. Frações das corridas foram coletadas por coletor de frações a cada 1 minuto e a atividade radioativa medida por contador gama automático (HIDEX, Finlândia) (124).

4.2.3.2. Processamento das imagens de PET e definição dos volumes de interesse

Para a segmentação das lesões, a ferramenta de segmentação automática, *Lesion Segmentation tool* (LST), do software SPM 8 foi utilizada para gerar máscaras individuais referente às lesões com hipersinal nas imagens de RM ponderadas em T2 (125). Como essa ferramenta possui diferentes limiares e algoritmos para detecção de lesões, a fim de minimizar eventuais erros na segmentação, uma amostra de pacientes com diferentes cargas lesionais foi selecionada e quatro limiares diferentes foram aplicados usando o algoritmo LGA (do inglês, *Lesion Growth Algorithm*) do LST. Após avaliação de neurologista (M.S.P) e neurorradiologista (C.R.) com experiência em esclerose múltipla, definiu-se o melhor limiar (0,1) para segmentação.

As máscaras de lesão-T2 geradas, além de caracterizar a distribuição das lesões, foram utilizadas para executar o procedimento de preenchimento, (do inglês, *“lesion filling”*) das lesões com hipossinal nas imagens de RM ponderadas em T1, conhecidas como *“black holes”*. Essas lesões podem ter intensidade de sinal semelhante à substância cinzenta cortical e/ou profunda e comprometer a segmentação anatômica baseada nas imagens de RM.

Os volumes de interesse (VOIs) foram definidos com uma abordagem passo a passo (*Maximum Probability Atlas*) usando a ferramenta PNEURO do PMOD 4.0 que promove a segmentação anatômica do encéfalo com base na RM individual e em um Atlas humano. As

imagens ponderadas em T1 preenchidas foram usadas para a segmentação individual de substância cinzenta, substância branca e líquido cefalorraquidiano (LCR) usando mapas a priori do SPM 8. Os VOIs foram definidos considerando esses mapas individuais de probabilidade de tecidos baseados em RM, restringindo os VOIs aos voxels com uma probabilidade de pertencer à substância cinzenta de pelo menos 50% e uma probabilidade de pertencer ao LCR de no máximo 50%. Considerando o perfil de acometimento global da patologia, o atlas padrão de Hammers foi adaptado para segmentar a substância cinzenta cortical e profunda e a substância branca gerando os seguintes VOIs:

- ✓ Substância cinzenta cortical (SCC)
- ✓ Núcleo caudado
- ✓ Tálamo
- ✓ Córtex cerebelar
- ✓ Corpo caloso (CC)
- ✓ Substância branca (SB), englobando toda a substância branca do cérebro e cerebelo, exceto, corpo caloso, que foi analisado separadamente como proxy de dano periventricular.

A máscara de lesão-T2 foi convertida em VOI utilizando a ferramenta PVIEW do PMOD 4.0 para ser utilizada na quantificação das imagens de PET. O VOI de substância branca de aparência normal (SBAN) foi gerado subtraindo-se o VOI de lesão-T2 do VOI de substância branca, conforme detalhado a seguir:

- ✓ VOI de substância branca subtraindo-se o VOI de lesão-T2 = VOI de substância branca de aparência normal (SBAN).

Todos os VOIs foram inspecionados visualmente pela investigadora principal (M.S.P.) para garantir uma segmentação precisa (**Figura 10**). Além disso, para levar em consideração o efeito do volume parcial nas regiões próximas aos ventrículos (corpo caloso e caudado), uma correção de volume parcial baseada em região, que estende o método da Matriz de Transferência Geométrica (GTM) e realiza uma correção baseada em voxel, foi aplicada usando a ferramenta PXMÓD do software PNEURO.

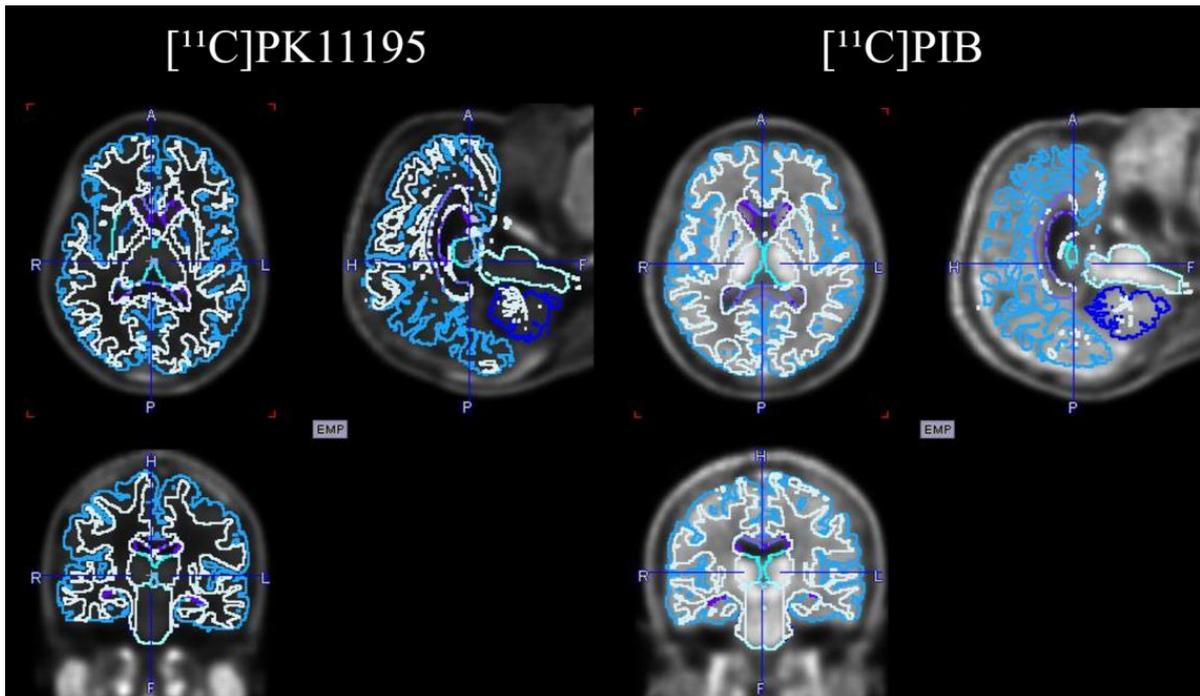


Figura 10 - VOIs sobrepostos à imagem de PET com $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$. Controle para checagem visual gerado ao final do processamento na ferramenta PNEURO do PMOD software.

NOTA: Para a segmentação dos VOIs foi utilizado um atlas padrão e a imagem de RM ponderada em T1 de cada sujeito de pesquisa.

SIGLAS: VOIs – *Volumes of Interest*; PET- *Positron Emission Tomography*; PIB - *Pittsburgh Compound B*; RM- Ressonância Magnética.

Finalmente, um total de 7 VOIs foram utilizados nas análises. Durante o processamento da imagem PET e RM, também foi extraído o volume total do VOI de lesão, usado como medida de carga lesional, e o volume intracraniano total (VIT), usado como medida de atrofia cerebral. O fluxograma completo estabelecido para a geração dos VOIs e extração das curvas de tempo-atividade (do inglês, *Time Activity Curves* - TACs), é descrito abaixo e resumido na **Figura 11**:

- ✓ A imagem T1 de RM, após preenchimento das imagens com hipossinal em T1 (T1-preenchido), foi usada como base para a segmentação anatômica. A imagem do pescoço foi removida para não interferir na segmentação encefálica. Para a segmentação, foi estabelecido dentro da ferramenta PNEURO, empregar o mapa de 3 probabilidades do SPM 8 com uma amostragem de 3 mm, também utilizada na etapa de normalização (essa imagem normalizada foi usada para segmentação incluindo núcleos da base);
- ✓ Foi aplicada correção de movimento para toda a imagem dinâmica de PET (21 timeframes), tendo os 11 primeiros timeframes como referência e utilizando método

de interpolação com uma taxa de amostragem de 2 pixels e uma suavização gaussiana de 6 mm;

- ✓ A imagem de PET e de RM foram co-registradas usando uma amostragem de 3 mm como parâmetro correspondente;
- ✓ Os segmentos do encéfalo foram delineados para criar VOIs considerando mapas de probabilidade individuais da RM com limiar no modo padrão da ferramenta (50% para substância cinzenta e líquido cefalorraquidiano);
- ✓ Finalmente, os VOIs criados foram usados para definir as TACs para ambas as imagens PETs, $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$.

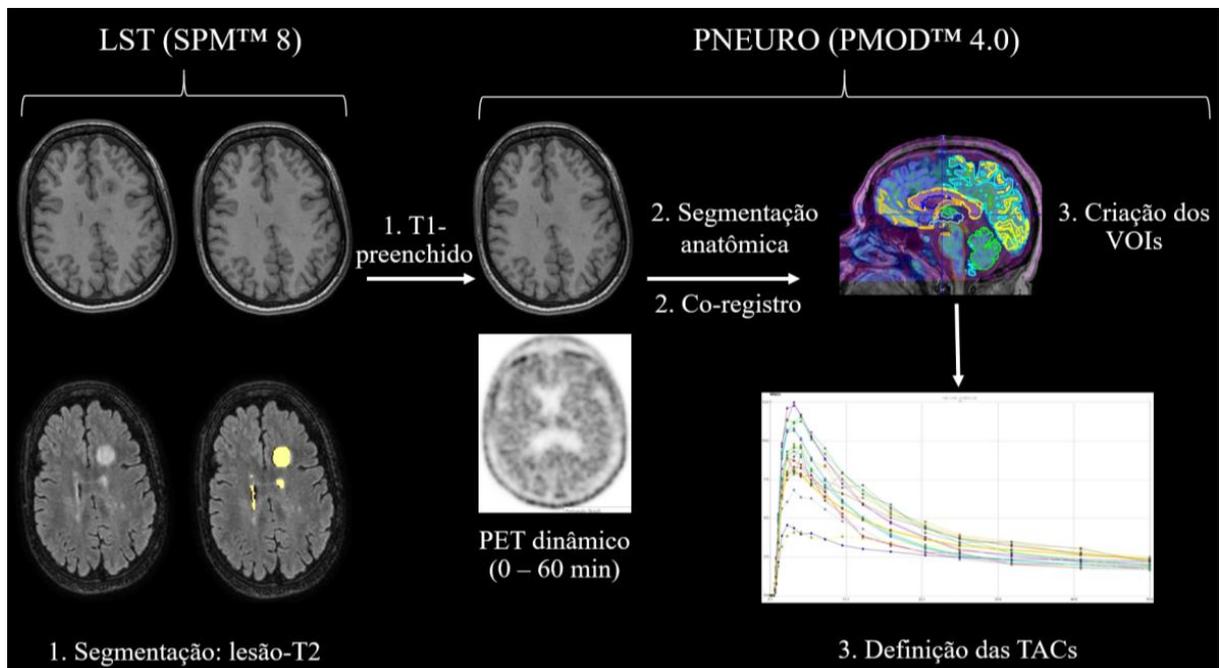


Figura 11 - Fluxograma de análise de imagem usando a ferramenta *Lesion Segmentation Tool* (SPM 8) e o módulo PNEURO (PMOD 4.0)

SIGLAS: LST - *Lesion Segmentation Tool*; SPM – *Statistical Parametric Mapping*; VOIs: *Volumes of Interest*; TACs: *Time Activity Curves*.

4.2.3.3. Análise e quantificação das imagens de PET com $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$

As curvas de tempo-atividade provenientes do processamento na ferramenta PNEURO foram empregadas para a análise farmacocinética do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ na ferramenta *Kinetic Modeling* do PMOD 4.1. Utilizou-se os dados de atividade plasmática e metabólitos obtidos durante a aquisição para extrair o volume total de distribuição (V_T) dos VOIs previamente determinados. O V_T foi estimado pelo método gráfico de Logan com a função de entrada

considerando atividade plasmática corrigida para metabólitos radioativos. O tempo de início do ajuste da linha foi fixado em 20 min, considerado como o tempo em que a fase linear (de equilíbrio do radiofármaco) foi alcançada.

4.2.3.4. Análise e quantificação das imagens de PET com [¹¹C]PIB

A análise das imagens de [¹¹C]PIB foi baseada no método gráfico de Logan usando um tecido de referência para determinar os valores de razão do volume de distribuição (do Inglês, *Distribution Volume Ratio* – DVR) de cada VOI. O cerebelo é a região mais comumente utilizada como tecido de referência em análise de deposição amiloide, contudo, considerando a heterogeneidade individual e o potencial envolvimento de todo o SNC na EM, um método validado (SUPERPIB software) para extrair uma região de referência para cada sujeito foi aplicado (126). Brevemente, esse método funciona modelando cada voxel de substância cinzenta como a combinação linear de três classes cinéticas predefinidas (substância cinzenta normal, substância cinzenta de alta ligação específica e pool de sangue). A função de entrada do tecido de referência é então determinada como a curva de tempo-atividade do VOI compreendendo todos os voxels com probabilidade de pelo menos 90% de pertencer à classe de referência (127). (**Figura 12**).

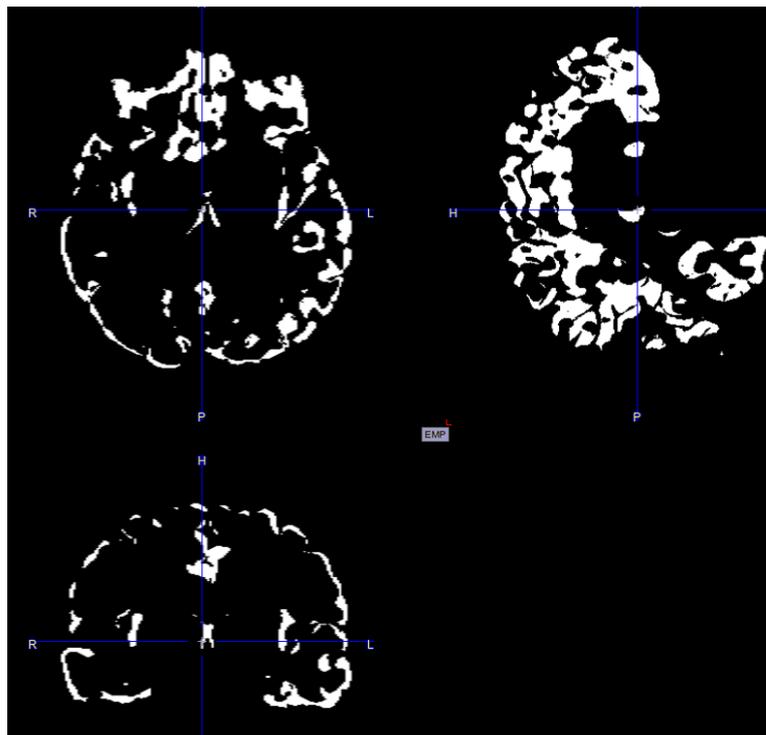


Figura 12 - Imagem ilustrativa do tecido de referência extraído utilizando a ferramenta SUPERPIB.

Após a extração da região que individualmente melhor representava a referência para cada participante, extraíram-se as curvas de tempo-atividade provenientes do processamento na ferramenta PNEURO empregadas para a análise farmacocinética do [^{11}C]PIB na ferramenta *Kinetic Modeling* do PMOD (versão 4.1), utilizando os tecidos de referência individuais como função de entrada e correção no método linearizado de Logan. O horário de início do ajuste da linha foi fixado em 20 minutos, considerado como o tempo em que a fase linear (de equilíbrio do radiofármaco) foi alcançada. Extraíram-se, então, para cada VOI, os valores de DVR.

4.2.3.5. Análise baseada em voxel (*Statistical parametric mapping*)

Para melhor caracterizar as diferenças de captação entre os grupos, mapas de V_T e potencial de ligação (do inglês, *binding potential*, BPnd) foram gerados a partir das imagens PET dinâmicas com [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB, respectivamente, usando a ferramenta PXMOD do software PNEURO. Posteriormente, uma análise baseada em voxels com SPM 12 (*Wellcome Trust Centre of Neuroimaging*, Londres, Reino Unido), rodando em MATLAB R2012a (MathWorks, Sherborn, Massachusetts) foi realizada.

Primeiramente, tanto os mapas de PET quanto as imagens de RM ponderadas em T1 foram orientados manualmente para colocar a comissura anterior na origem do sistema de coordenadas tridimensional MNI. As imagens ponderadas em T1 foram processadas usando *Diffeomorphic Anatomical Through Exponentiated Lie Algebra* (DARTHEL) e as etapas, incluindo as máscaras de SB, SC e LCR, usadas na normalização espacial dos conjuntos de dados de imagem T1 de cada indivíduo foram então aplicadas a ambas as imagens PET a fim de alcançar a normalização espacial para o espaço MNI (128). Por fim, todas as imagens PET normalizadas espacialmente foram suavizadas com um filtro Gaussiano de 8 mm em FWHM.

Modelo de análise de variância (ANOVA) entre grupos e testes t entre dois grupos ajustados para idade e sexo foram então conduzidos para investigar as diferenças na captação em ambas as imagens PET separadamente. As estatísticas resultantes foram inicialmente consideradas com um limiar de $P \leq 0,001$ não corrigido para comparações múltiplas no nível de voxel e o cluster foi relatado como significativo ao ultrapassar o nível de $P_{\text{FWE}} \leq 0,05$ e com tamanho mínimo de 10 voxels. Os achados foram sobrepostos à imagem ponderada em T1 média de cada fenótipo de EM e controles.

4.3. *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas usando SPSS (IBM SPSS Statistics para Windows, versão 22.0. Armonk, NY: IBM Corp) e PRISM (GraphPad Software, Inc. Versão 6.01 para Windows). As distribuições das variáveis contínuas foram avaliadas por valores de assimetria e curtose, bem como por métodos gráficos. Aquelas com distribuição normal foram apresentadas como média \pm desvio padrão (DP), enquanto os dados com distribuição não normal foram apresentados como mediana e mínimo-máximo ou intervalo interquartil (Q_1/Q_3). As variáveis categóricas foram comparadas usando o teste exato de Fisher. Para variáveis contínuas, foram utilizadas comparações de dois grupos, teste t de Student não pareado ou teste de Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados. Para comparações de três grupos, foram usados os testes ANOVA de uma via ou Kruskal-Wallis seguidos pelo post hoc de Bonferroni. Para cada VOI predefinido (substância cinzenta cortical, córtex cerebelar, tálamo, caudado, corpo caloso, substância branca/SBAN e lesão T2 total), um modelo linear generalizado ajustado para idade e sexo foi usado para avaliar as diferenças na captação de traçador entre indivíduos saudáveis controles e pacientes, e entre fenótipos – neste último, o uso de DMT foi adicionado ao modelo. Para avaliar associações entre os dois traçadores dentro de cada VOI, o teste de correlação de Pearson ou Spearman foi aplicado a depender da distribuição dos dados.

Para explorar as associações entre incapacidade funcional em pacientes com EM e as variáveis PET, foram aplicados modelos de regressão linear ajustados para idade, sexo e fenótipo, incluindo a interação entre os dois traçadores para cada VOI. O teste de 9 pinos (9HPT), o teste de caminhada de 25 pés (T25FW) e o PASAT da MSFC foram considerados separadamente para avaliar as associações entre velocidade de membros superiores, inferiores e função cognitiva, respectivamente, juntamente com EDSS e SDMT. Um valor extremo de 9HPT, definido como três vezes o intervalo interquartil abaixo do 1º quartil (Q_1) ou acima do 3º quartil (Q_3), foi excluído das análises. O índice R^2 foi relatado como a proporção da variância explicada pelo modelo, enquanto a força proporcional de cada preditor independente foi relatada pelos coeficientes padronizados (β) e respectivo intervalo de confiança de 95%. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$ e todas as análises foram bicaudais.

5. RESULTADOS

A coleta de dados iniciou-se em outubro de 2017 e finalizou em dezembro de 2019. Foram realizadas 150 aquisições de neuroimagem (PET/RM) em 75 participantes, sendo: 30 pacientes com EMRR, 21 pacientes com EMP e 24 controles saudáveis. Quatro pacientes foram excluídos das análises, sendo 2 por dados inconsistentes de sangue para uso como função de entrada para a quantificação do PET com $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, 1 por artefatos de movimento e 1 por uso corticosteroides nas 4 semanas anteriores ao exame, que foi relatado somente após a realização dos procedimentos. Dos 24 voluntários saudáveis que foram recrutados da comunidade pareados por idade, sexo e anos de educação, 6 foram excluídos das análises, sendo 3 por causa de alterações estruturais inesperadas nas imagens de PET/RM, 2 por dados inconsistentes de sangue para uso como função de entrada para a quantificação do PET com $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$, e 1 por conta de aquisição incompleta devido a claustrofobia. Assim, a coorte final incluiu 65 indivíduos, 47 pacientes com EM e 18 controles saudáveis como demonstrado na **Figura 13**.

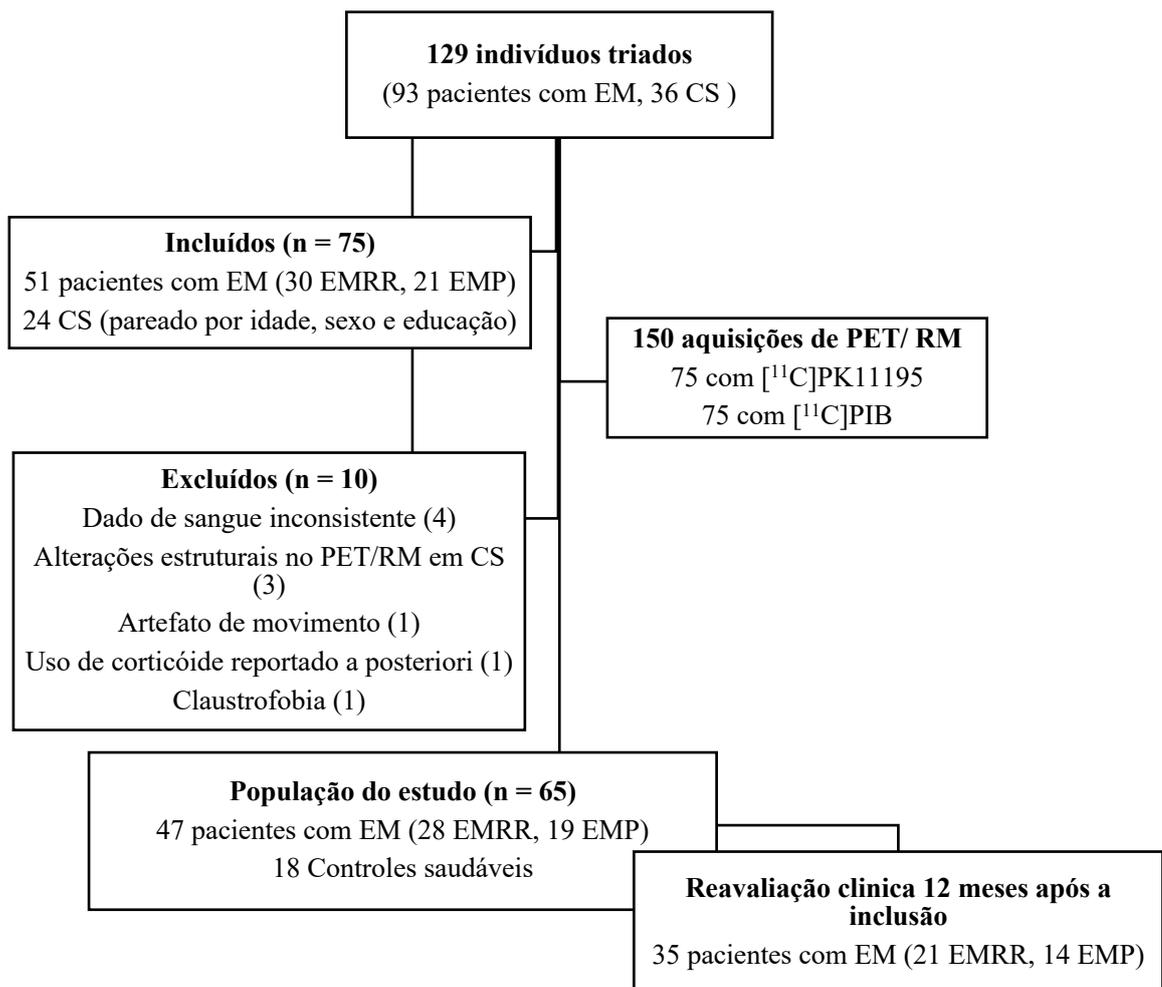


Figura 13 - Fluxograma do estudo

SIGLAS: EM- Esclerose Múltipla; CS- Controles Saudáveis; EMRR- Esclerose Múltipla Recorrente Remitente; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva; PET- *Positron Emission Tomography*; RM- Ressonância Magnética e PIB- *Pittsburgh Compound B*.

Os protocolos excluídos e as respectivas razões que motivaram as exclusões estão especificadas em detalhes na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Exclusões do protocolo de pesquisa.

Grupo	Sexo	Idade	Motivo da exclusão
CS	F	45 anos	Alterações inesperadas no PET com [¹¹ C]PIB (anômala baixa captação cerebral global)
CS	F	23 anos	Dados inconsistentes de sangue para utilização como <i>input</i> para a quantificação do PET com [¹¹ C]PK11195
CS	M	26 anos	Alterações inesperadas na RM (calcificações severas em núcleos da base)
CS	F	56 anos	Alterações inesperadas no PET com [¹¹ C]PIB (captação cortical sugerindo depósito amiloide)
CS	M	51 anos	Protocolo incompleto (fobia)
CS	F	49 anos	Dados inconsistentes de sangue para utilização como <i>input</i> para a quantificação do PET com [¹¹ C]PK11195
EMP	M	51 anos	Uso de corticoide menos de 4 semanas antes da inclusão (reportado posteriormente)
EMP	M	52 anos	Bobina de RM utilizada diferente e artefatos de deglutição (disfagia grave)
EMRR	M	32 anos	Dados inconsistentes de sangue para utilização como <i>input</i> para a quantificação do PET com [¹¹ C]PK11195
EMRR	F	36 anos	Dados inconsistentes de sangue para utilização como <i>input</i> para a quantificação do PET com [¹¹ C]PK11195

SIGLAS: CS- Controle Saudável; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva; EMRR; Esclerose Múltipla Recorrente-remitente; F- Feminino; M- Masculino; PET- *Positron Emission Tomography*; PIB- *Pittsburgh Compound B* e RM- Ressonância Magnética.

5.1. Caracterização descritiva da amostra

Considerando toda a coorte, não houve diferença entre pacientes e controles em relação à idade, sexo, raça e anos de educação. Dos 47 pacientes incluídos, 31 eram mulheres com idade média de 41,3 (\pm 10,6) anos e dos 18 controles saudáveis, 13 eram mulheres com idade média de 42,1 (\pm 12,2) anos. Em relação aos grupos clínicos, 28 pacientes apresentavam o fenótipo EMRR e 19 o fenótipo EMP, composto por 11 pacientes com EM primariamente progressiva e 8 com EM secundariamente progressiva. Em concordância com a epidemiologia da patologia, os pacientes com EMRR eram mais jovens com uma média de idade de 35,8 (\pm 7,9) anos,

quando comparados aos pacientes com EMP que apresentaram uma média de idade de 49,3 (\pm 8,9) anos ($P < 0,001$).

No tocante à avaliação funcional, os pacientes com EM tiveram pior desempenho funcional nos testes 9HPT ($P < 0,001$), T25FW ($P < 0,001$) e SDMT ($P = 0,017$) quando comparados aos controles saudáveis. Na inclusão, 7 pacientes foram considerados com comprometimento cognitivo com base nos testes SDMT e PASAT. Dentre os fenótipos, os pacientes com EMP apresentaram maior incapacidade quando comparados com os pacientes com EMRR, com mediana de 6,5 na escala EDSS ($P < 0,001$), *z-score* de $-6,5$ no 9HPT, ($P = 0,002$) e *z-score* de $-10,9$ no T25FW ($P < 0,001$).

Dentre os 28 pacientes com fenótipo EMRR, a média de tempo de doença foi de 9 anos, sendo observado uma mediana de 4 surtos no decorrer da doença e uma taxa anualizada de surtos (TAS) de 0,9. Dentre os 19 pacientes com fenótipo progressivo (EMP), a média de tempo de doença foi de 12 anos, sendo observado uma mediana de 1 surto no decorrer da doença e uma TAS de 0,36, inferior a taxa observada no grupo EMRR ($P < 0,001$). Nos 12 meses prévios a inclusão, 10 (35,7%) pacientes com fenótipo EMRR e 3 (15,8%) pacientes com fenótipo EMP reportaram surto. Dos 47 pacientes incluídos, 35 pacientes compareceram à reavaliação clínica e funcional após 12 meses. Desses, 13 apresentaram um evento clínico durante o seguimento, 5 pacientes reportaram surtos e 8 apresentaram progressão da incapacidade independente de surtos.

Considerando toda a coorte de pacientes com EM, 18 foram classificados como doença ativa na inclusão (14 EMRR, $P = 0,047$). Além dos 13 pacientes que reportaram surtos nos 12 meses anteriores à inclusão, 6 pacientes apresentaram lesões com captação de contraste na RM do estudo, sendo 5 (16,7%) pacientes do grupo EMRR e 1 (5,3%) paciente do grupo EMP ($P = 0,384$). A carga lesional, mensurada pelo volume de lesões nas sequências de RM ponderada em T2, teve mediana semelhante, sendo 23,1 ml no grupo EMRR e 29,6 ml no grupo EMP ($P = 0,298$). Não foi observada diferenças no volume intracraniano total (VIT) entre controles e pacientes, ou entre os fenótipos.

Os tratamentos de rotina foram mantidos durante o estudo, e dos 47 pacientes incluídos 36 (77%) estavam em uso de drogas modificadora da doença (DMD). Destes, 14 (39%) pacientes em drogas injetáveis de plataforma (7 em interferon e 7 em acetato de glatirâmer), 11 (31%) em uso de anticorpo monoclonal (natalizumabe), 8 (22%) em uso de DMDs orais (7 pacientes em fingolimode e 1 em dimetil fumarato) e 3 (8%) usando drogas imunossupressoras clássicas (2 em metotrexato, 1 em azatioprina). Somente 2 pacientes do grupo EMRR estavam sem DMD (1 em período de transição entre medicações, 1 por escolha pessoal) e dos 26

pacientes em tratamento, 12 (46%) estavam em uso de DMD injetáveis de plataforma, 8 (31%) em uso de anticorpo monoclonal e 6 (23%) em uso de terapia oral. Dos 19 pacientes com EMP, 9 (47,4%) pacientes estavam sem terapia imunomoduladora e dos 10 (52,6%) em tratamento, 2 (10,5%) estavam em uso de DMDs injetáveis de plataforma, 2 (10,5%) em uso de DMD oral, 3 (15,8%) de anticorpo monoclonal e 3 (15,8%) de imunossupressores clássicos.

As principais características demográficas, clínicas e de RM da população do estudo estão resumidas na **Tabela 2**. Merece destaque que a raça foi categorizada de acordo com a autodeclaração da cor da pele, sendo divididos em brancos (autodeclarados), e não-brancos (autodeclarados pardos, negros ou asiáticos)

Tabela 2 - Principais características demográficas, clínicas e de ressonância magnética dos participantes do estudo.

	CS (n = 18)	EM (n = 47)	P CS vs EM	EMRR (n = 28)	EMP (n = 19)	P EMRR vs EMP
Dados demográficos						
Sexo, F/M	13 / 5	31 / 16	0,770 ^a	20 / 8	11 / 8	0,366 ^a
Idade, anos, média ± DP	42,1 ± 12,2	41,3 ± 10,6	0,799 ^b	35,8 ± 7,9	49,3 ± 8,9	<0,001^b
Raça, brancos/ não-brancos	8 / 10	27 / 20	0,347 ^a	16 / 12	11 / 8	0,959 ^a
Educação, anos, média ± DP	13,9 ± 3,9	13,2 ± 3,9	0,553 ^c	13,8 ± 3,6	12,3 ± 4,4	0,171 ^c
Dados clínicos						
EDSS, mediana (min-máx)	-	3,5 (1,0-7,5)	-	2,5 (1,0, 6,0)	6,5 (3,5, 7,5)	<0,001^b
9HPT <i>z-score</i> , mediana (Q ₁ /Q ₃)	0,1 (-0,9 / 0,6)	-2,5 (-6,0 / -0,8)	<0,001^c	-1,9 (-3,2 / -0,7)	-6,5 (-10,0 / -2,6)	0,002^c
T25FW <i>z-score</i> , mediana (Q ₁ /Q ₃)	0,4 (-0,2 / 0,8)	-2,4 (-8,1 / -0,6)	<0,001^c	-0,7 (-2,0 / 0,1)	-10,9 (-60,3 / -4,1)	<0,001^c
PASAT <i>z-score</i> , média ± DP	-0,6 ± 1,1	-0,8 ± 1,2	0,574 ^b	-0,8 ± 1,3	-0,9 ± 1,0	0,810 ^b
SDMT <i>z-score</i> , média ± DP	-0,1 ± 0,7	-0,8 ± 0,9	0,017^b	-0,7 ± 0,9	-0,9 ± 0,9	0,434 ^b
Tempo de doença, anos, média ± DP	-	10,4 ± 6,3	-	9,5 ± 6,0	11,8 ± 6,8	0,213 ^b
N total de surtos, mediana (min-máx)	-	3 (0 - 36)	-	4 (1 - 36)	1 (0 - 15)	0,005^c
TAS na inclusão, mediana (Q ₁ /Q ₃)	-	0,68 (0,14 / 1,00)	-	0,90 (0,27 / 1,25)	0,36 (0 / 0,35)	0,001^c
Pacientes usando DMD, n (%)	-	36 (76,6%)	-	26 (92,9%)	10 (52,6%)	0,003^a
Doença ativa, n (%)	-	18 (38,3%)	-	14 (50%)	4 (21,1%)	0,047^a
Surtos no ano prévio a inclusão, n (%)	-	13 (27,7%)	-	10 (35,7%)	3 (15,8%)	0,134
Dados de ressonância magnética						
Lesões captantes de Gd, n (%)	-	6 (12,8%)	-	5 (17,9%)	1 (5,3%)	0,378 ^a
Carga lesional T ₂ , ml, mediana (Q ₁ /Q ₃)	-	25,8 (12,3 / 44,3)	-	23,1 (11,5 / 36,1)	29,6 (12,7 / 60,9)	0,298 ^c
VIT, ml, média ± DP	1452,7 ± 153,3	1454,8 ± 144,5	0,959 ^b	1448,3 ± 157,8	1464,3 ± 125,9	0,713 ^b

NOTA: ^a Teste exato de Fisher; ^b Teste T de Student não-pareado; ^c Teste U de Mann-Whitney; Significância estatística, considerada com valor de $P < 0,05$, em negrito.

SIGLAS: CS- Controle Saudável; EM- Esclerose Múltipla; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva; EMRR- Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente; EDSS – *Expanded Disability Status Scale*; PASAT- *Paced Auditory Serial Addition Test*; SDMT- *Symbol Digit Modalities Test*; 9HPT- *9 Hole Peg Test*; T25FW- *Timed 25 Foot Walking*; TAS- Taxa Anualizada de Surto; DMD- Droga Modificadora de Doença; Gd: gadolínio e VIT- Volume Intracraniano Total.

Considerando os volumes regionais avaliados por imagem de RM, os pacientes diferiram dos controles demonstrando menores médias em todas as regiões avaliadas. Contudo, somente o volume de substância cinzenta cortical (SC cortical) foi diferente entre os fenótipos, sendo o menor volume observado na população com fenótipo EMP ($P = 0,006$). As diferenças regionais nos volumes cerebrais estão demonstradas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Volumetria baseada na imagem de RM dos participantes do estudo.

	CS (n = 18)	EM (n = 47)	P^a CSvsEM	EMRR (n = 28)	EMP (n = 19)	P^a EMRRvs EMP
SC cortical volume, média ± DP	365,2 ± 20,5	336,4 ± 25,6	<0,001	344,7 ± 25,7	324,1 ± 20,5	0,006^b
Substância branca, média ± DP	293,3 ± 29,0	272,6 ± 30,6	0,016	267,3 ± 35,7	280,6 ± 19,3	0,145
SBAN, média ± DP	292,1 ± 28,8	257,8 ± 37,4	0,001	254,3 ± 42,9	262,9 ± 27,7	0,443
Corpo Caloso, média ± DP	13,0 ± 0,9	11,4 ± 1,7	<0,001	11,5 ± 1,8	11,3 ± 1,5	0,759
Córtex cerebelar, média ± DP	66,7 ± 5,8	62,1 ± 5,9	0,006	63,3 ± 6,2	60,3 ± 5,0	0,091
Caudado, média ± DP	5,2 ± 0,4	4,1 ± 1,0	<0,001	4,2 ± 1,1	4,0 ± 0,9	0,453
Tálamo, média ± DP	9,3 ± 0,6	8,3 ± 1,1	0,001	8,3 ± 0,1	8,4 ± 0,9	0,805

NOTA: ^a Teste T de Student não-pareado. Valores representados por média e desvio padrão. Volumes cerebrais regionais normalizados para o volume intracraniano total (x 1.000 para representação). Significância estatística, considerada com valor de $P < 0,05$, em negrito.

SIGLAS: RM- Ressonância Magnética; CS- Controle Saudável; EM- Esclerose Múltipla; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva; EMRR- Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente; SC- Substância Cinzenta; SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

5.2. *Captação de [¹¹C]PK11195 e [¹¹C]PIB em pacientes com esclerose múltipla versus controles saudáveis*

Em relação ao perfil de células da resposta imune inata, avaliada através do PET TSPO, não foram observadas diferenças estatísticas no volume de distribuição (V_T) do [¹¹C]PK11195 ao comparar pacientes com EM e controles saudáveis (CS), utilizando os modelos lineares generalizados ajustados para idade e sexo dentre os volumes de interesse (VOIs) estudados (**Figura 14 A e C**). Em relação ao conteúdo de mielina, medido através do volume de distribuição (DVR) do [¹¹C]PIB na imagem PET, os pacientes apresentaram menor captação no corpo caloso quando comparados aos controles ($P = 0,019$, **Figura 14 B**) e menor DVR do [¹¹C]PIB foi também observado nas lesões T2 quando comparado à substância branca (SB) em CS ($P < 0,001$) e às regiões de substância branca de aparência normal (SBAN) em pacientes

com EM ($P < 0,001$), demonstrando a perda acentuada do conteúdo de mielina nas lesões (Figura 14 D). A Figura 14 demonstra a distribuição de ambos os radiofármacos em cada uma das regiões estudadas em controles e pacientes com EM.

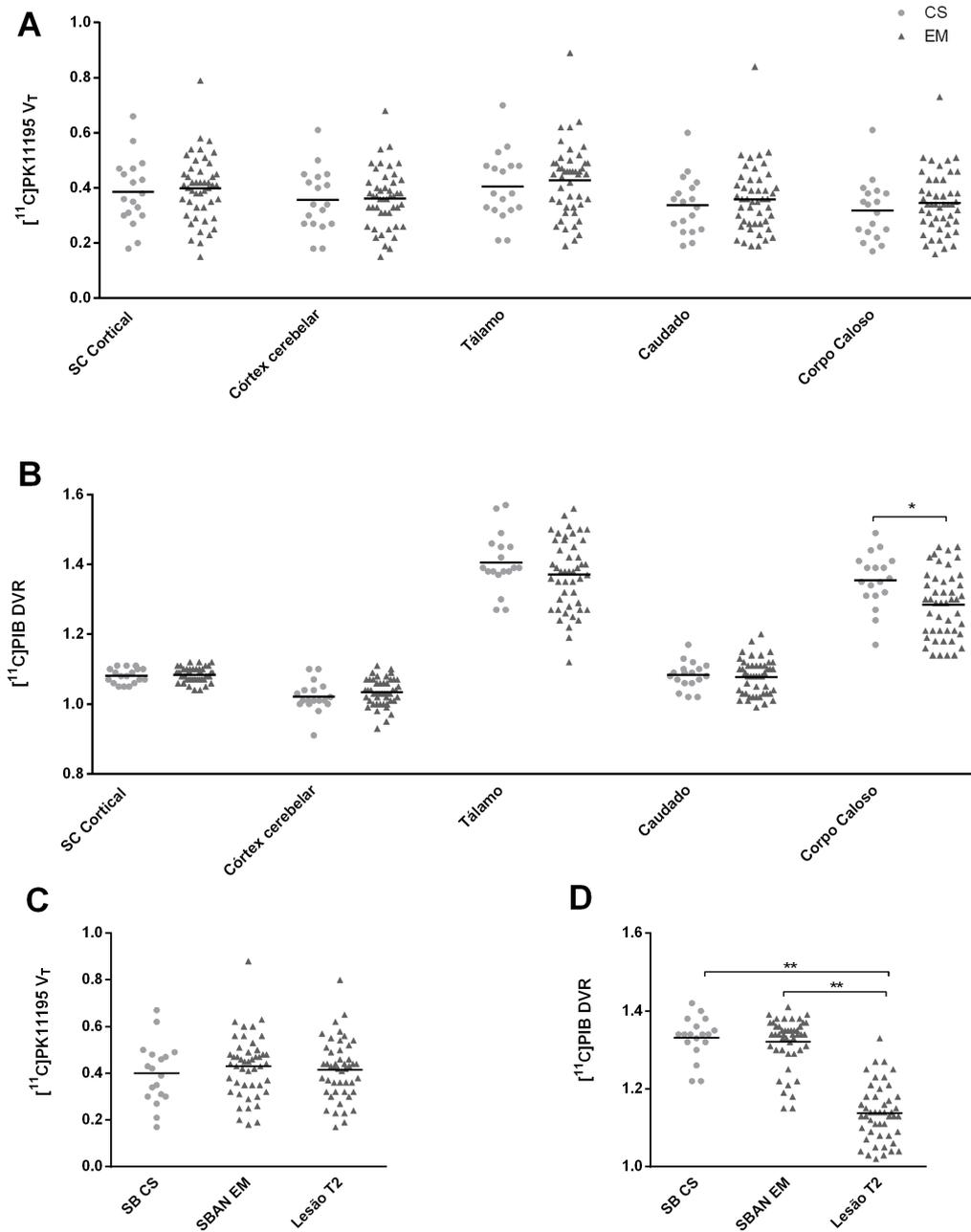


Figura 14- Volume de distribuição (V_T) do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e razão de volume de distribuição (DVR) do $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ em pacientes com EM e controles saudáveis.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) e (B) $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ (DVR) em CS ($n = 18$) e pacientes com EM ($n = 47$); (C) $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ V_T e (D) $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ DVR comparando lesões T2, SBAN de pacientes com EM e substância branca de controles. Modelos lineares generalizados ajustados para idade e sexo foram utilizados para análises estatísticas (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: CS- Controles Saudáveis; EM = esclerose múltipla; DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T- Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

A **Tabela 4** detalha as medianas, e valores mínimos e máximos de captação de ambos os radiofármacos em cada VOI estudado.

Tabela 4 - Volume de distribuição (V_T) do [¹¹C]PK11195 e razão do volume de distribuição (DVR) do [¹¹C]PIB em controles saudáveis e pacientes com EM.

VOI	CS (n = 18)	EMRR (n = 28)	EMP (n = 19)	P ^a
SC Cortical				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.49 (0.27-0.87)	0.53 (0.27-1.13)	0.55 (0.39-0.80)	0.734
[¹¹ C]PIB DVR	1.12 (1.07-1.16)	1.13 (1.09-1.17)	1.14 (1.10-1.18)	0.578
Córtex Cerebelar				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.44 (0.26-0.75)	0.45 (0.25-0.95)	0.46 (0.33-0.65)	0.650
[¹¹ C]PIB DVR	1.09 (1.06-1.19)	1.11 (1.04-1.19)	1.10 (1.07-1.19)	0.272
Tálamo				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.45 (0.27-0.82)	0.52 (0.27-1.16)	0.53 (0.37-0.76)	0.680
[¹¹ C]PIB DVR	1.5 (1.33-1.64)	1.60 (1.35-1.77)	1.60 (1.25-1.68)	0.245
Caudado^b				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.34 (0.19-0.60)	0.34 (0.19-0.84)	0.36 (0.23-0.53)	0.647
[¹¹ C]PIB DVR	1.08 (1.02-1.17)	1.09 (0.99-1.20)	1.08 (1.01-1.15)	0.896
Corpo Caloso^b				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.32 (0.17-0.61)	0.34 (0.16-0.73)	0.34 (0.23-0.51)	0.540
[¹¹ C]PIB DVR	1.35 (1.17-1.49)	1.30 (1.14-1.45)	1.25 (1.14-1.37)	0.054
SB/SBAN				
[¹¹ C]PK11195 V _T	0.34 (0.19-0.62)	0.40 (0.18-0.88)	0.43 (0.27-0.55)	0.122
[¹¹ C]PIB DVR	1.44 (1.26-1.59)	1.47 (1.18-1.59)	1.47 (1.22-1.58)	0.737
Lesão T2				
[¹¹ C]PK11195 V _T	-	0.27 (0.02-0.68)	0.30 (0.16-0.44)	0.114
[¹¹ C]PIB DVR	-	1.09 (0.96-1.25)	1.11 (0.98-1.31)	0.885

NOTA: Valores demonstrados em mediana (mínimo – máximo). ^a Modelo linear geral ajustado para idade, sexo foi utilizado para a análise estatística. Significância estatística, considerada com valor de $P < 0,05$, em negrito. ^bValores ajustados para efeito de volume parcial com método baseado em voxel.

SIGLAS: CS- Controle Saudável; EM- Esclerose Múltipla; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva e EMRR- Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca; SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

Não foram observadas correlações significativas entre os dois radiofármacos dentro dos VOIs analisados, conforme demonstrado na **Figura 15**.

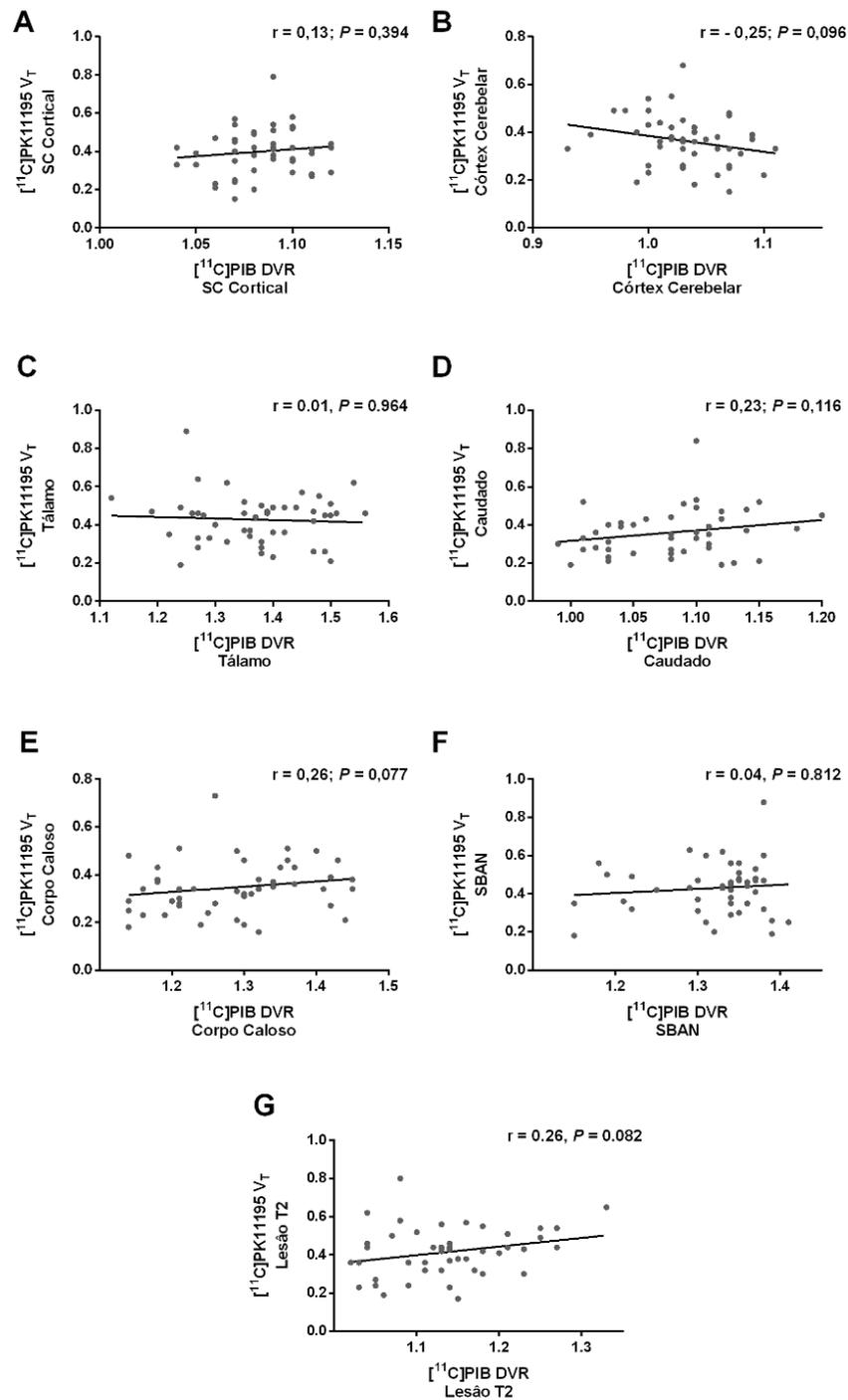


Figura 15 - Correlação entre Volume de distribuição (V_T) de $[^{11}\text{C}]$ PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de $[^{11}\text{C}]$ PIB nas regiões estudadas

NOTA: Gráficos de dispersão mostram associação entre as variáveis sem ajuste, os valores de r resultam de uma correlação de Spearman ou Pearson, a depender da normalidade dos dados. Significância estatística considerada com valor de $P < 0,05$.

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- *Substância Cinzenta*; e SBAN- *Substância Branca de Aparência Normal*.

5.3. Captação de [¹¹C]PK11195 e [¹¹C]PIB nos fenótipos clínicos de esclerose múltipla versus controles saudáveis

Na análise subdividindo os pacientes em grupos fenotípicos, igualmente não foram observadas diferenças na captação de [¹¹C]PK11195 (V_T) entre os grupos nos modelos lineares generalizados ajustados para idade, sexo e DMD (**Figura 16 A**). Uma menor captação de [¹¹C]PIB (DVR) foi observada no corpo caloso dos pacientes com fenótipo EMP quando comparada aos controles, contudo não foi observada diferença significativa na comparação entre os fenótipos (**Figura 16 B**). O mesmo padrão de menor captação de [¹¹C]PIB (DVR) foi observado nas lesões T2 e SBAN de ambos os fenótipos quando comparados à SB dos controles (**Figura 16 D**). Nenhum dos radiofármacos foi capaz de diferenciar os fenótipos clínicos nas regiões estudadas. A **Figura 16** demonstra a distribuição dos radiofármacos em cada uma das regiões estudadas dentre os fenótipos.

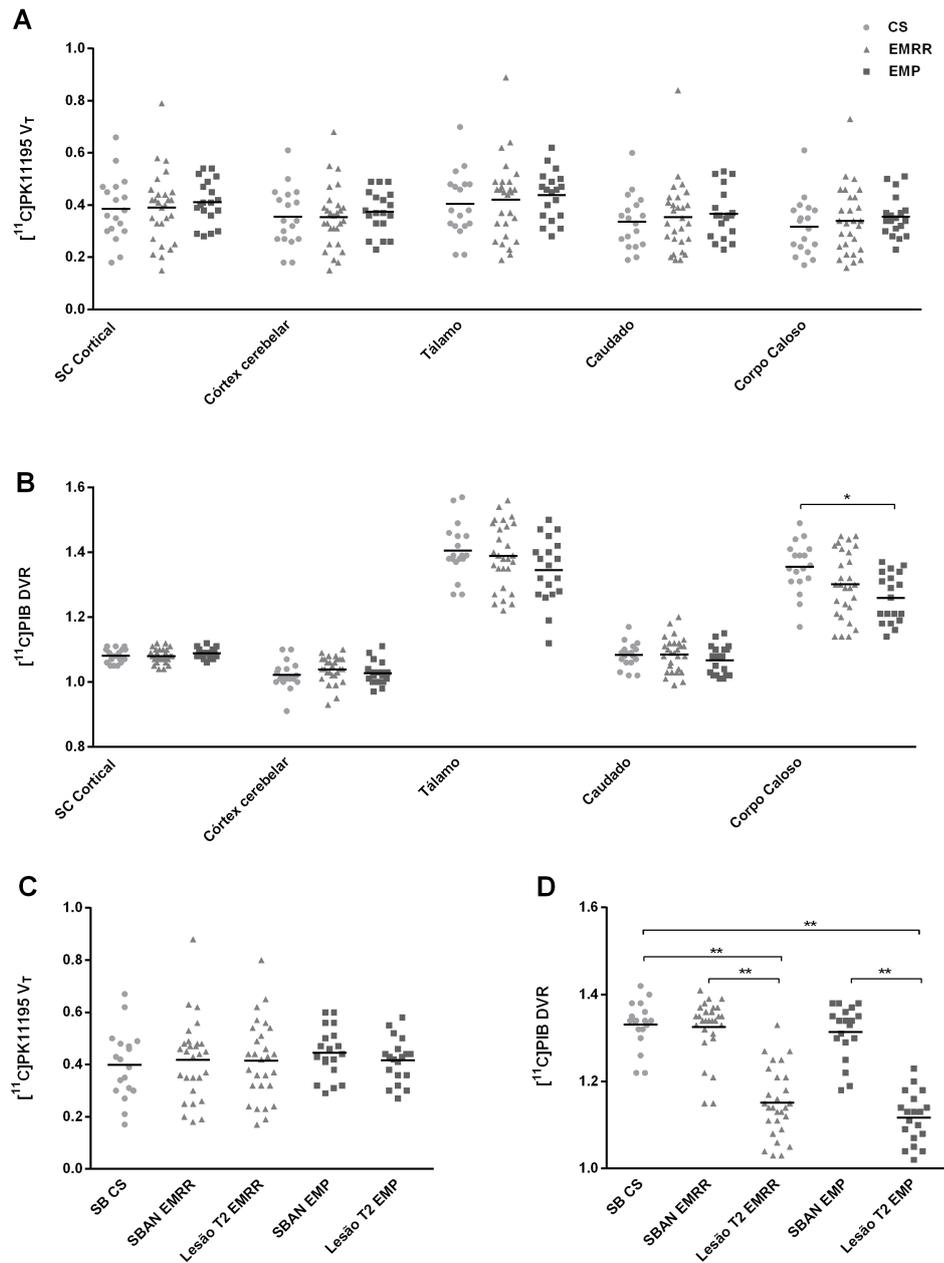


Figura 16- Volume de distribuição (V_T) do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e razão de volume de distribuição (DVR) do $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ dentre os fenótipos de EM e controles saudáveis.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) e (B) $[^{11}\text{C}]\text{PIB DVR}$ em CS ($n = 18$), pacientes com EMRR ($n = 28$) e pacientes com EMP ($n = 19$); (C) Captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) e (D) $[^{11}\text{C}]\text{PIB (DVR)}$ comparando lesões T2, SBAN de pacientes com EM e SB de controles. Modelos lineares generalizados ajustados para idade, sexo e DMD foram utilizados para análises estatísticas (significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: CS- Controles Saudáveis; EMRR- Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente; EMP- Esclerose Múltipla Progressiva; DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal; DMD- Droga Modificadora de Doença.

Adicionalmente não foram observadas diferenças em relação à captação regional de ambos os radiofármacos entre os subgrupos do fenótipo EMP, EM primariamente progressivos (EMPP) e secundariamente progressivos (EMSP), conforme demonstrado na (Figura 17).

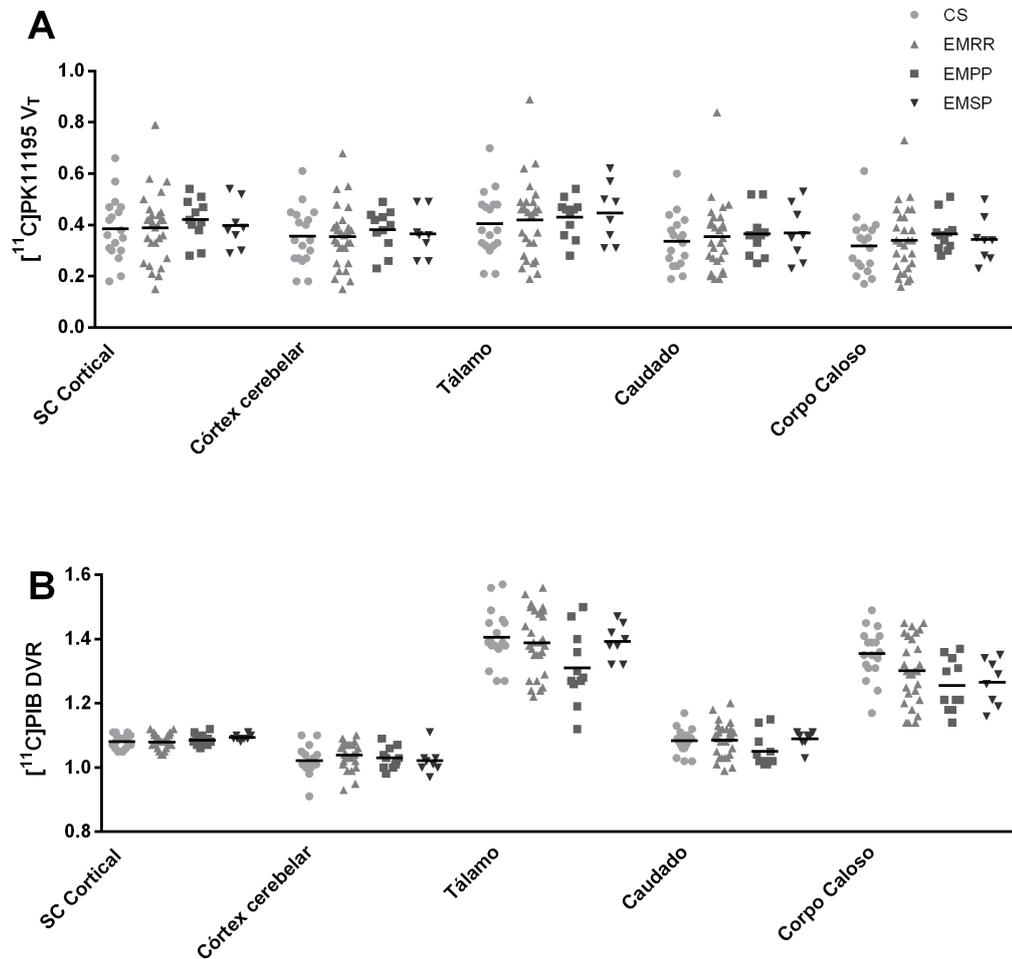


Figura 17 - Volume de distribuição (V_T) de $[^{11}\text{C}]$ PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de $[^{11}\text{C}]$ PIB dentre os fenótipos de EM, subdividindo o grupo de pacientes com fenótipo progressivo.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de $[^{11}\text{C}]$ PK11195 (V_T) e (B) $[^{11}\text{C}]$ PIB DVR em controles saudáveis ($n = 18$), pacientes com EMRR ($n = 28$), pacientes com EMPP ($n = 11$) e pacientes com EMSP ($n = 8$). Modelos lineares generalizados ajustados para idade, sexo e DMD foram utilizados para análises estatísticas (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: CS- Controles Saudáveis; EMRR- Esclerose Múltipla Recorrente-Remitente; EMPP- Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva; EMSP- Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal; DMD- Droga Modificadora de Doença.

5.4. Captação de [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB de acordo com eventos clínicos na inclusão e seguimento

5.4.1. Atividade da doença e comprometimento cognitivo na inclusão

Dos 47 pacientes com EM, 18 pacientes foram classificados como doença ativa (14 EMRR, $P = 0,047$), e 7 apresentaram-se com comprometimento cognitivo na inclusão. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na captação de [^{11}C]PK11195 ou [^{11}C]PIB dentre esses subgrupos conforme demonstrados na **Figura 18** e **Figura 19**.

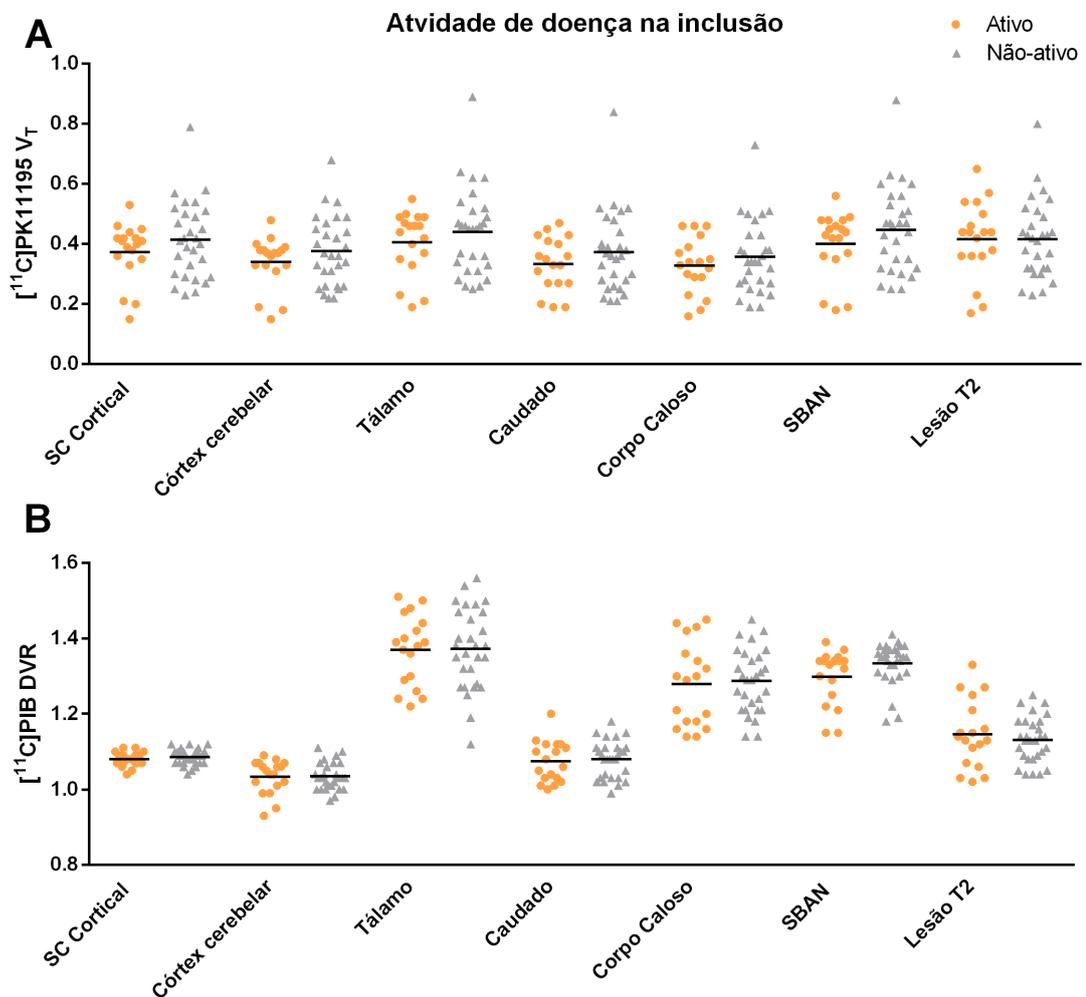


Figura 18- Volume de distribuição (V_T) de [^{11}C]PK11195 e razão de volume de distribuição (DVR) de [^{11}C]PIB de acordo com atividade de doença na inclusão.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de [^{11}C]PK11195 (V_T) e (B) [^{11}C]PIB DVR acordo com atividade de doença. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

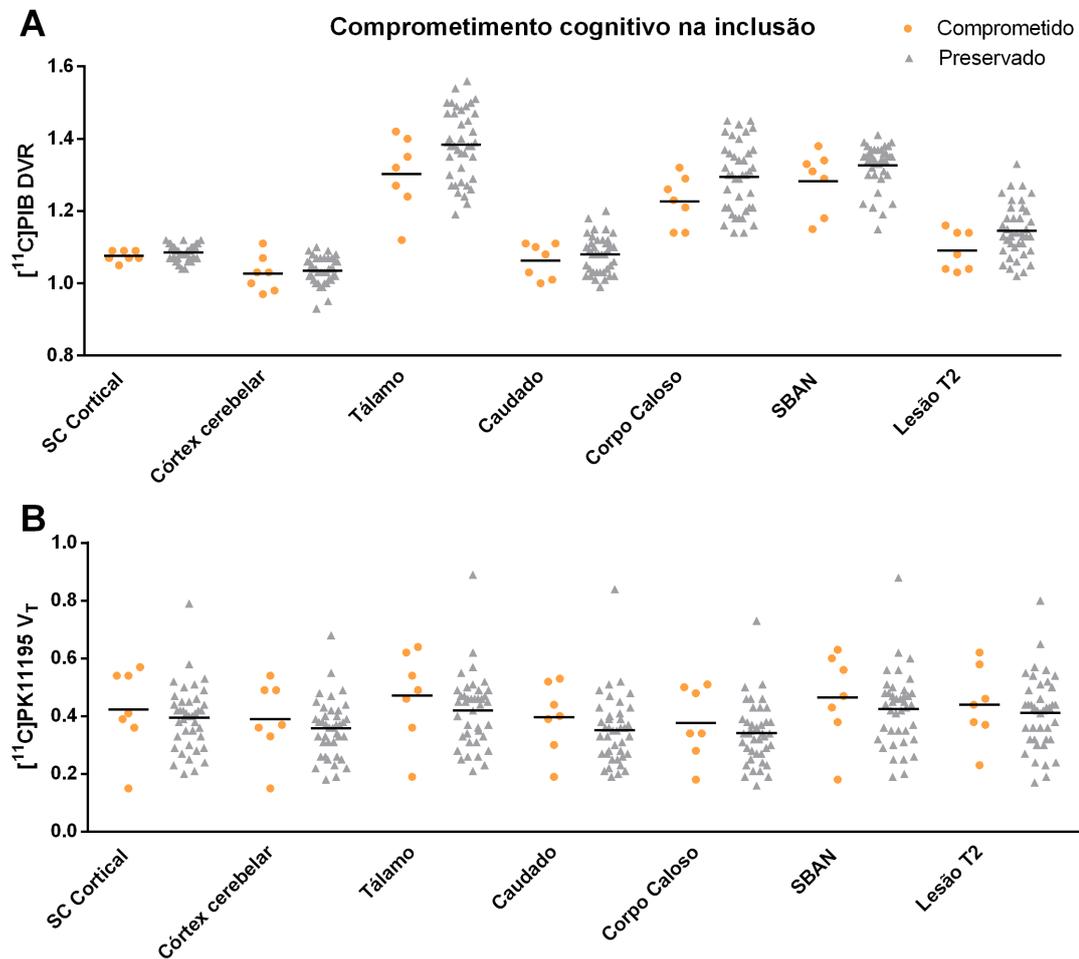


Figura 19 - Razão de volume de distribuição (DVR) de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e volume de distribuição (V_T) de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e de acordo com comprometimento cognitivo na inclusão

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ DVR e (B) $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) acordo com comprometimento cognitivo. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

5.4.2. Eventos clínicos no seguimento

Dos 47 pacientes incluídos, 35 foram reavaliados após 12 meses. Destes, 13 apresentaram um evento clínico durante o seguimento, 5 pacientes tiveram surtos e 8 apresentaram progressão da incapacidade independente de surtos. As distribuições de captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ são demonstradas também subdividindo de acordo com a presença de surtos

e progressão da incapacidade independente de surtos no seguimento (**Figura 20**). Nenhum padrão específico foi observado na captação de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ (**Figura 21**).

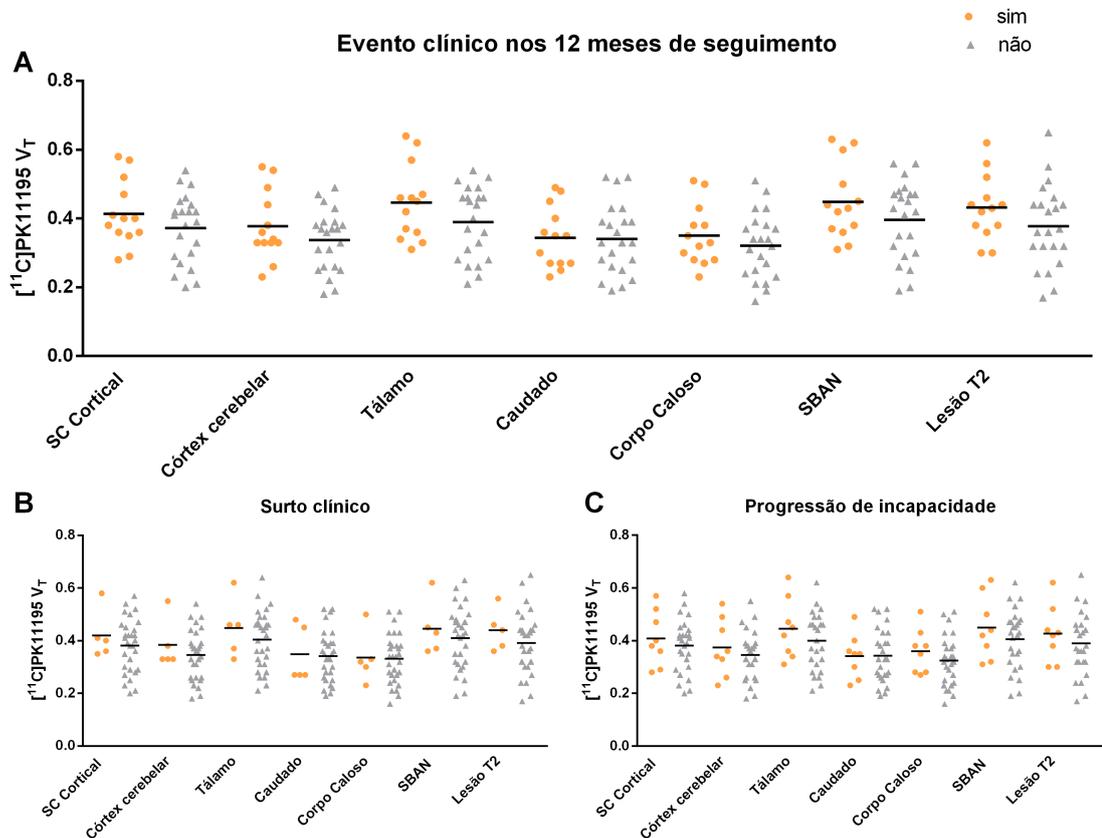


Figura 20 - Volume de distribuição (V_T) de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ de acordo com evento clínico no seguimento.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) de acordo evento clínico, e subdivido por tipo de evento clínico: em (B) surto e em (C) progressão. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$).

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

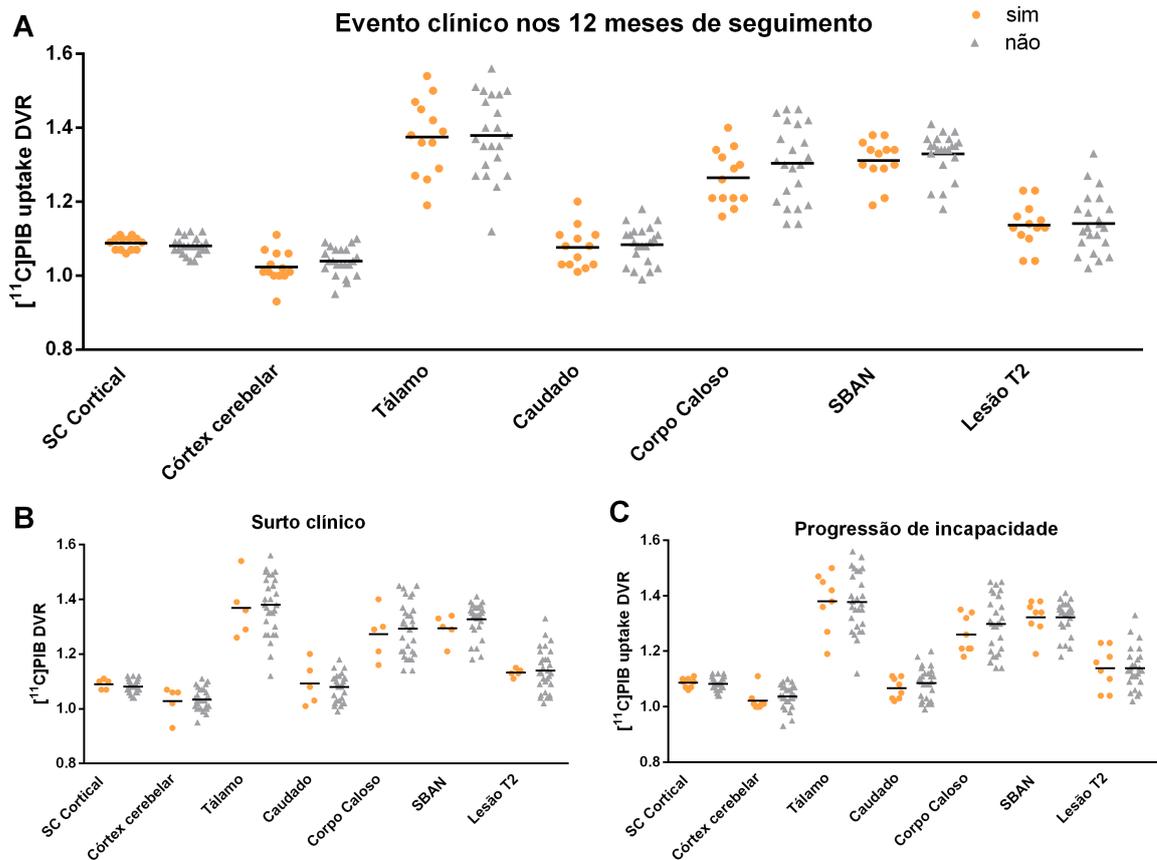


Figura 21 -Razão do volume de distribuição (DVR) de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ de acordo com evento clínico no seguimento.

NOTA: Gráficos de dispersão representando média e todos os valores dos dados. (A) Captação de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ (DVR) de acordo evento clínico, e subdivido por tipo de evento: em (B) surto e em (C) progressão. Teste de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística (Significância estatística considerada com valor de $*P < 0,05$, $**P < 0,001$).

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca e SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

5.5. Associação entre a captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e incapacidade funcional

Maior incapacidade funcional medida pela escala EDSS foi independentemente associada a maior captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ (V_T) e menor captação de $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ (DVR) no corpo caloso ($P = 0,001$, $P = 0,023$, respectivamente), núcleo caudado ($P = 0,015$, $P = 0,008$, respectivamente), lesão T2 ($P=0,007$, $P=0,012$, respectivamente), e exclusivamente com maior captação de $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ em SBAN ($P = 0,022$), tálamo ($P = 0,016$), SC cortical ($P = 0,026$) e córtex cerebelar ($P = 0,022$). No teste de funcionalidade de membros superiores, 9HPT, um

pior desempenho também foi associado a maior captação de [^{11}C] PK11195 (V_T) na SC cortical ($P = 0,035$), córtex cerebelar ($P = 0,047$), caudado ($P = 0,010$), corpo caloso ($P = 0,011$), lesão T2 ($P = 0,031$), e SBAN ($P = 0,037$). Inversamente, melhores pontuações no teste de velocidade de processamento, SDMT, foram associadas com maior conteúdo de mielina no corpo caloso ($\beta = 0,49$, $P = 0,001$), e uma associação inversa significativa com ativação de células imunes inatas foi observada na mesma região ($\beta = -0,38$, $P = 0,013$).

Para o EDSS e 9HPT, mas não para o SDMT, o fenótipo EMP foi um preditor independente de pior desempenho em todos os VOIs cerebrais avaliados. Não houve associações significativas entre os achados de PET e o teste de marcha, T25FW, e com o teste cognitivo PASAT. Nenhuma interação significativa foi observada entre ambos os traçadores dentro de cada VOI analisado. As principais associações com incapacidade funcional são apresentadas na **Figura 22** - Associações entre volume de distribuição (V_T) do [^{11}C]PK11195 e incapacidade funcional medida pela escala EDSS (A-G) e pelo SDMT (H). e **Figura 23**. Os coeficientes β padronizados, intervalo de confiança de 95% e R^2 dos modelos são apresentados na **Tabela 5** para cada VOI.

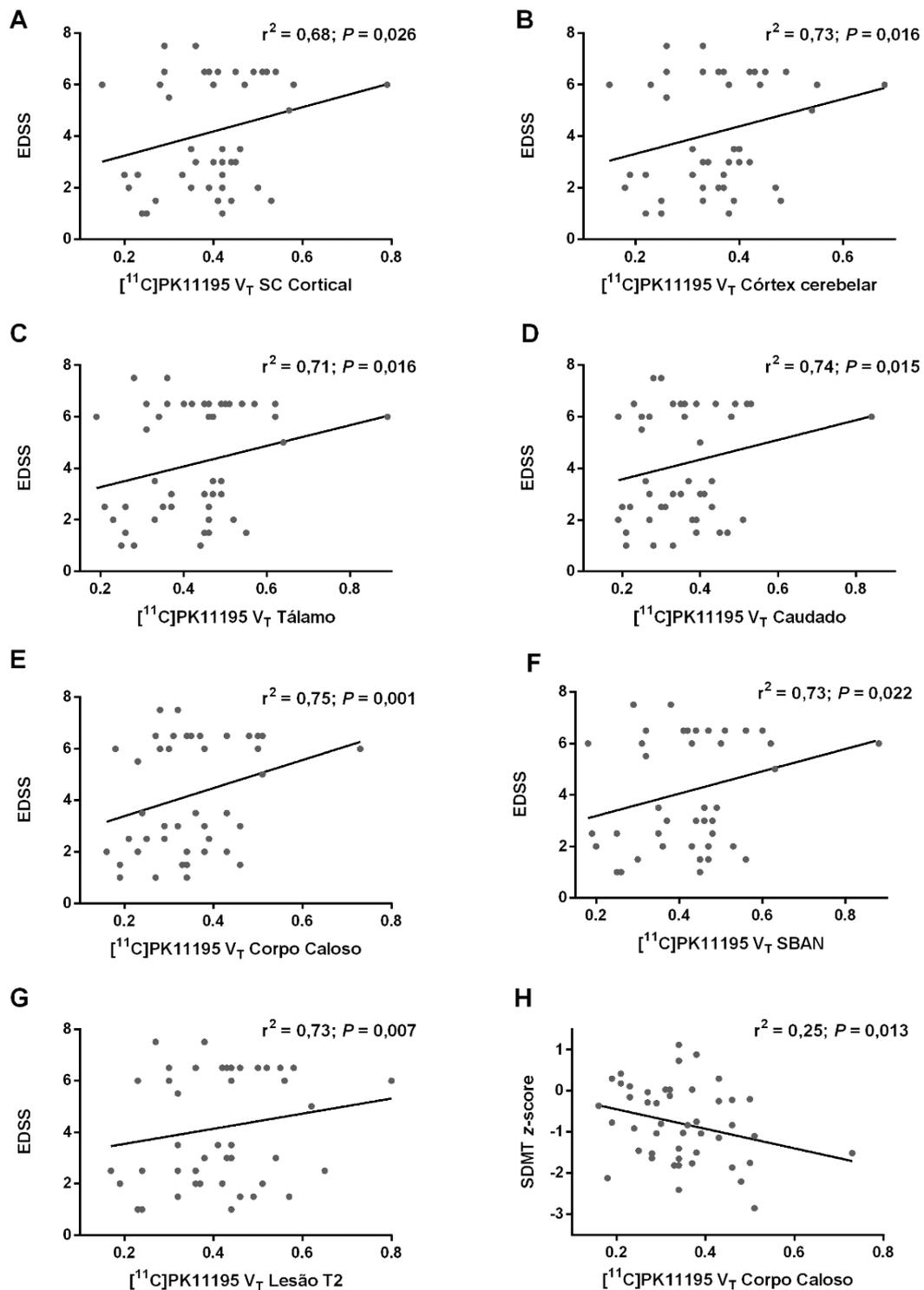


Figura 22 - Associações entre volume de distribuição (V_T) do $[^{11}\text{C}]\text{PK11195}$ e incapacidade funcional medida pela escala EDSS (A-G) e pelo SDMT (H).

NOTA: R^2 do modelo de regressão linear construído para cada VOI ajustado para idade, sexo, fenótipo e ambos os traçadores, incluindo a interação entre eles.

SIGLAS: V_T - Volume de distribuição; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca; SBAN- Substância Branca de Aparência Normal; EDSS-*Expanded Disability Status Scale*; SDMT- *Symbol Digit Modality Test*.

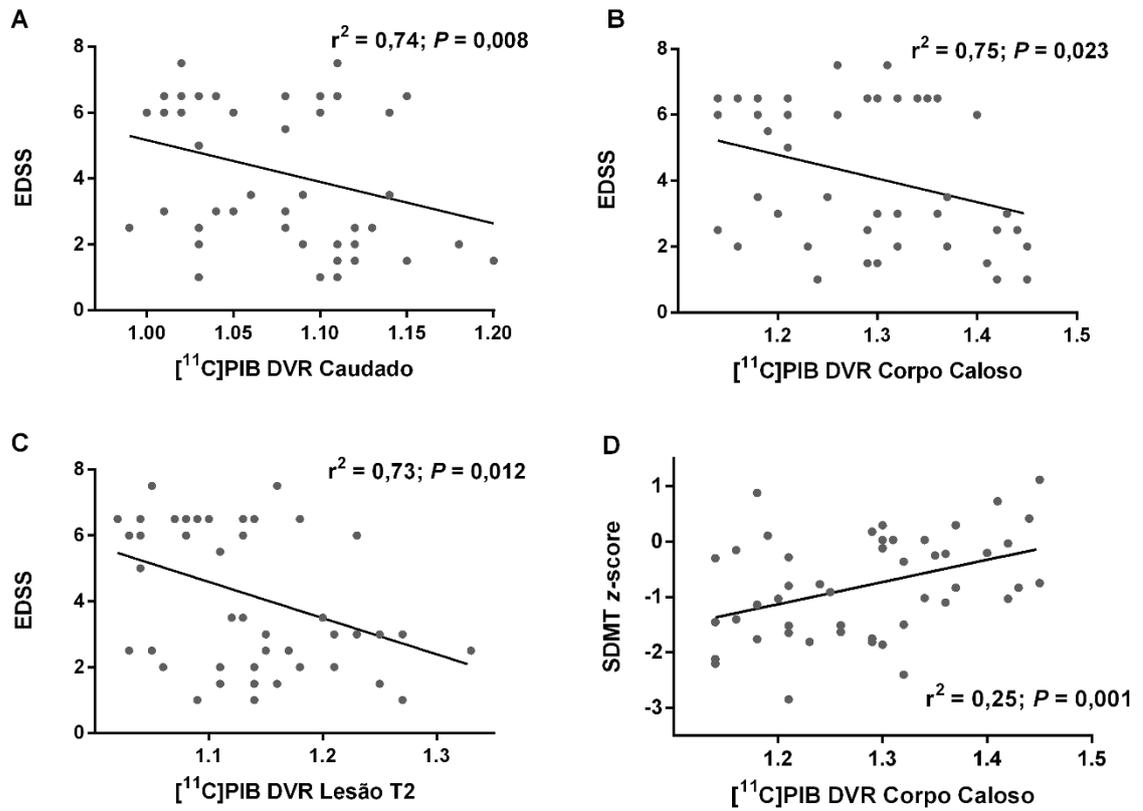


Figura 23 - Associações entre razão de volume de distribuição (DVR) do $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ e incapacidade funcional medida pela escala EDSS (A-C) e pelo SDMT (D).

NOTA: R^2 do modelo de regressão linear construído para cada VOI ajustado para idade, sexo, fenótipo e ambos os traçadores, incluindo a interação entre eles.

SIGLAS: DVR- *Distribution Volume Ratio*; PIB- *Pittsburgh Compound B*; SC- *Substância Cinzenta*; SB- *Substância Branca*; SBAN- *Substância Branca de Aparência Normal*; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; SDMT- *Symbol Digit Modality Test*.

Tabela 5 - Associações entre volume de distribuição (V_T) do [^{11}C]PK11195 e razão do volume de distribuição (DVR) do [^{11}C]PIB e medidas de incapacidade funcional na EM.

VOI	EDSS			9HPT z-score					
	Coefficiente β	95% IC	<i>P</i>	R^2 ajustado ^a	Coefficiente β	95% IC	<i>P</i>	R^2 ajustado ^a	
SC cortical									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,20	0,46 / 6,80	0,026	0,68	- 0,27	- 18,4 / - 0,69	0,035	0,36	
Córtex Cerebelar									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,23	0,76 / 6,75	0,016	0,73	- 0,28	- 21,78 / - 0,13	0,047	0,29	
Tálamo									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,23	0,76 / 6,75	0,016	0,71	- 0,24	- 16,35 / 0,71	0,579	0,39	
Caudado									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,20	0,77 / 6,77	0,015	0,74	- 0,36	- 21,87 / - 3,19	0,010	0,36	
[^{11}C]PIB DVR	- 0,23	- 17,14 / - 2,77	0,008		- 0,34	- 24,71 / 18,94	0,791		
Corpo Caloso									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,31	2,70 / 9,35	0,001	0,75	- 0,36	- 23,71 / - 3,33	0,011	0,37	
[^{11}C]PIB DVR	- 0,19	- 7,91 / - 0,63	0,023		0,26	- 3,05 / 19,28	0,150		
SBAN									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,19	0,47 / 5,77	0,022	0,73	- 0,28	- 16,84 / - 0,55	0,037	0,33	
Lesão T2									
[^{11}C]PK11195 V_T	0,24	1,17 / 7,01	0,007	0,73	- 0,30	- 18,81 / - 0,97	0,031	0,36	
[^{11}C]PIB DVR	- 0,24	- 12,50 / - 1,61	0,012		0,18	- 6,51 / 27,03	0,223		

NOTA: ^aUm modelo de regressão linear foi construído para cada VOI ajustando para idade, sexo, fenótipo e ambos os traçadores, incluindo a interação entre eles. Para todos os modelos representados, o fenótipo progressivo foi um preditor independente de incapacidade motora com um coeficiente β padronizado variando de 0,71 a 0,78 para EDSS e -0,58 a -0,70 para 9HPT. Nenhuma interação entre [^{11}C]PK11195 (V_T) e [^{11}C]PIB (DVR) foi observada nos modelos analisados.

SIGLAS: VOI- *Volume of interest*; EDSS- *Expanded Disability Status Scale*; 9HPT- *9 Hole Peg Test*; V_T - Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; EMRR- esclerose múltipla recorrente-remittente; EMP- esclerose múltipla progressiva; CS- controle saudável; SC- Substância Cinzenta; SB- Substância Branca; SBAN- Substância Branca de Aparência Normal.

5.6. *Análise baseada em voxel dos mapas de [¹¹C]PK11195 e [¹¹C]PIB - Statistical Parametric Mapping*

Um aumento da captação de [¹¹C]PK11195 foi difusamente observado na SB de pacientes com EM em comparação com CS, considerando o limiar inicial de significância não corrigido para múltiplas comparações ($P < 0,001$) (**Figura 24 A e B**). Esse achado foi particularmente mais pronunciado e difuso no grupo EMP (**Figura 24 C e D**). Em relação ao conteúdo de mielina, considerando o limiar inicial não corrigido, foi observada uma diminuição da captação de [¹¹C]PIB nas regiões SB, incluindo o corpo caloso, ao comparar pacientes com EM aos CS (**Figura 24 E e F**), sendo esse achado mais pronunciado no grupo EMRR (**Figura 24 G e H**). A **Figura 24** - Análise SPM dos mapas de [¹¹C]PK11195 (V_T) e [¹¹C]PIB (BP_{nd}) entre os fenótipos de EM e controles saudáveis. ilustra os resultados da análise paramétrica a nível de voxel no limiar inicial não corrigido ($P < 0,001$), e a **Tabela 6** mostra os clusters filtrados ($P_{FWE} \leq 0,05$).

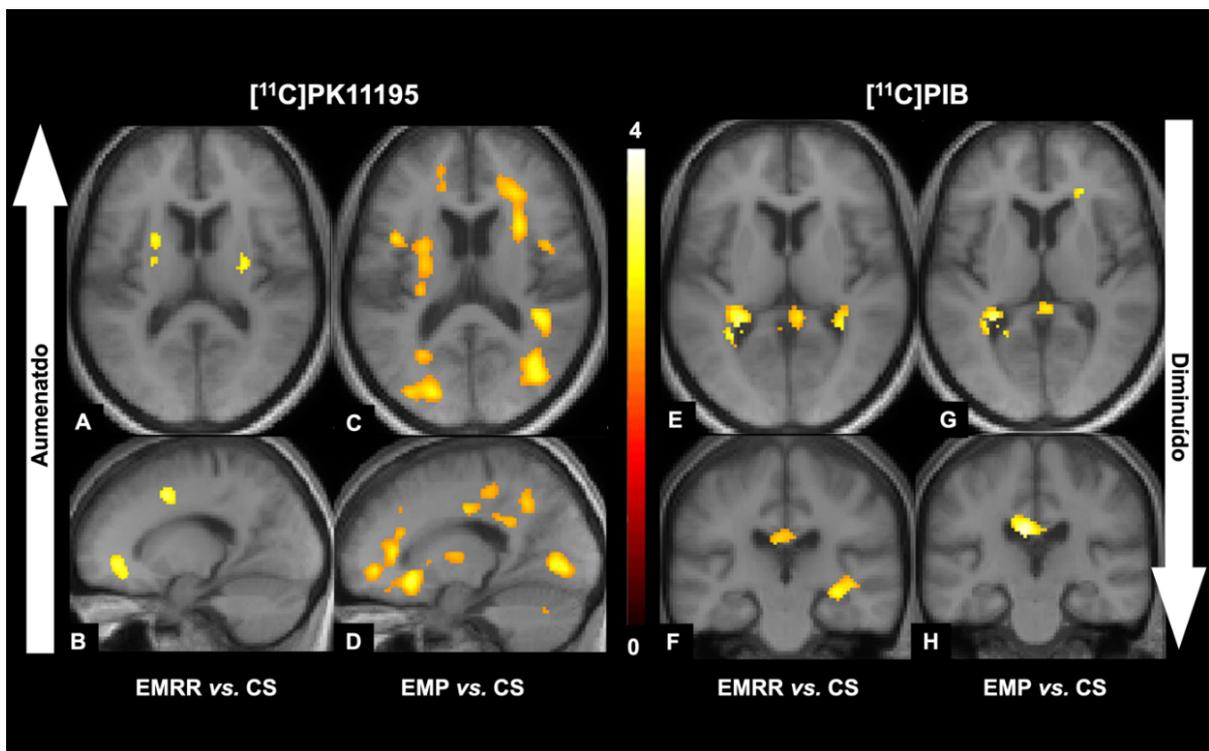


Figura 24 - Análise SPM dos mapas de [¹¹C]PK11195 (V_T) e [¹¹C]PIB (BP_{nd}) entre os fenótipos de EM e controles saudáveis.

NOTA: Diferenças ilustrativas correspondentes a um valor de $P < 0,001$ não-corrigido e utilizando um limiar mínimo de 10 voxels. A barra de cores denota o valor T. Os achados são sobrepostos uma imagem ponderada em T1 média de cada fenótipo de EM.

SIGLAS: V_T- Volume de distribuição; PIB- *Pittsburgh Compound B*; EMRR=esclerose múltipla recorrente-remitente; EMP: esclerose múltipla progressiva; CS=controle saudável.

Tabela 6 - Resultado da análise paramétrica baseada em voxel dos mapas de [¹¹C]PK11195 (V_T) e [¹¹C]PIB (BPnd): diferenças entre os fenótipos de EM e controles saudáveis.

Região cerebral Coordenadas (x,y,z) ^a	Tamanho do Cluster ^b	Pico <i>Z score</i> ^c	<i>P</i> ^d (Cluster)		
			FWE	FDR	Não- corrigido
Aumento de [¹¹C]PK11195 em pacientes com EMP					
SB – Coroa radiada direita (24, 34, 6)	2704	4,92	<0,001	0,001	<0,001
SB – Coroa radiada esquerda (-26, -38, 32)	2429	4,81	<0,001	0,001	<0,001
SB do giro occipital lateral esquerdo (-32, -76, 2)	1754	4,29	0,001	0,006	0,001
SB – Fascículo longitudinal superior direito (40, - 40, 12)	3643	4,26	<0,001	<0,001	<0,001
Diminuição de [¹¹C]PIB (BPnd) em pacientes com EMRR					
SB - Fascículo longitudinal superior esquerdo (-28, - 50, 4)	534	4,83	0,024	0,048	0,010

NOTA: ^a Coordenadas do *Montreal Neurological Institute* (MNI) do voxel de significância estatística máxima dentro de cada cluster; ^b Número de voxels contíguos incluídos em cada cluster de diferença entre grupos; ^c *Z score* para o voxel de significância estatística máxima em cada cluster de diferença entre os grupos; ^d Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos relacionadas para todo o cérebro quando $P < 0,05$ a nível do cluster e uma extensão mínima de 10 voxels.

SIGLAS: V_T- *Volume de distribuição*; PIB- *Pittsburgh Compound B*; EMRR - esclerose múltipla recorrente-remitente, EMP - esclerose múltipla progressiva; FWE- *family-wise error*, FDR- *false discovery rate*; SB – substância branca.

Por fim, a **Figura 25** ilustra a captação difusa e heterogênea de [¹¹C]PK11195 em um paciente com EMP e a diminuição acentuada na captação de [¹¹C]PIB em lesão periventricular de um paciente com EMRR.

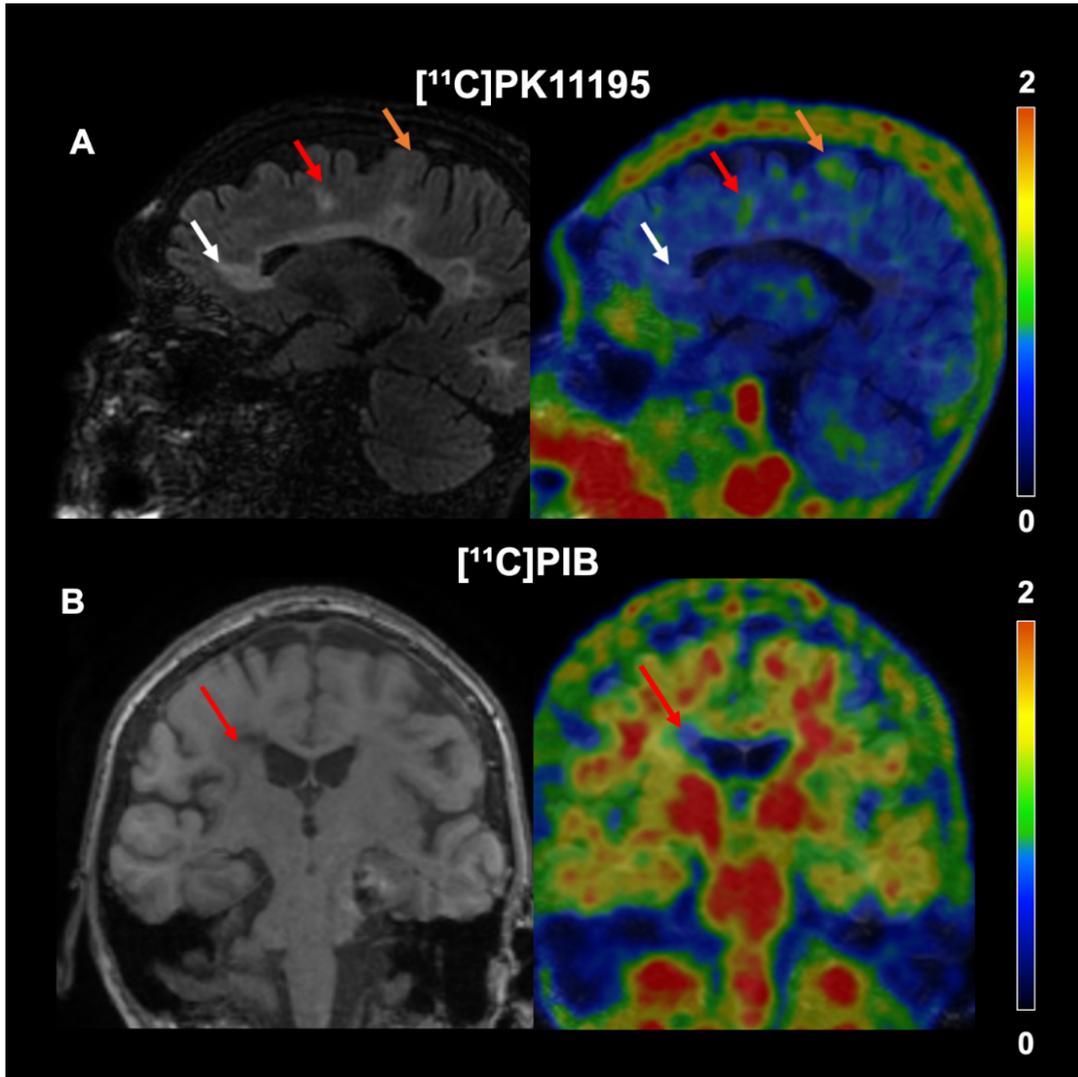


Figura 25- Imagens ilustrativas de PET/RM com [¹¹C] PK11195 e [¹¹C]PIB. Em A, uma sequência FLAIR de RM, seguida de uma imagem fusionada com o PET [¹¹C]PK11195 de um paciente com fenótipo de EMP exibindo a heterogeneidade das lesões no tocante ao perfil de células da resposta imune inata: uma lesão clássica na sequência FLAIR, não observada na PET [¹¹C]PK11195 (seta branca), uma lesão que é vista tanto na imagem PET quanto na RM (seta vermelha) e por fim, uma lesão detectada apenas pelo PET (seta laranja). Em B, imagem de RM ponderada em T1 seguida de imagem fusionada com PET [¹¹C]PIB em um paciente com fenótipo EMRR exibindo a perda acentuada de mielina em uma lesão próxima aos ventrículos (seta vermelha).

NOTA: A barra de cor indica o valor de captação padronizado (SUV).

SIGLAS: *PIB*- Pittsburgh Compound EMRR - esclerose múltipla remitente-recorrente; EMP-: esclerose múltipla progressiva

5. DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da amostra

Considerando as características epidemiológicas e clínicas, a amostra estudada é semelhante à descrita na literatura. Os pacientes com fenótipo EMRR são em sua maioria mulheres jovens com menor incapacidade, apesar de apresentarem mais surtos no decorrer da doença. Por outro lado, os pacientes com EMP apresentam idade mais avançada, menor predomínio do gênero feminino e maior incapacidade, a despeito do menor número de surtos. Esses achados são bem descritos e traduzem a representatividade da amostra selecionada para esse estudo (46).

A análise das imagens de RM demonstrou redução de volume cerebral em todas as regiões nos grupos de pacientes quando comparado aos controles saudáveis traduzindo um processo de atrofia relacionado à doença já observado em diversos estudos (75, 96, 129-133). A redução do volume da SC cortical foi a única diferença regional entre fenótipos, sendo mais pronunciado nos pacientes com EMP, o que possivelmente se deve tanto à desmielinização cortical quanto a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos agregados linfóides subpiais existentes desde os estágios iniciais da doença, mas mais prevalentes na forma progressiva (57, 134, 135).

Importante notar que no grupo EMP o número de lesões captantes de contraste, ou seja, lesões com quebra de BHE foi menor enquanto a atrofia foi mais acentuada, especialmente na SC cortical, diferindo do grupo EMRR. Esses achados favorecem a teoria de que, apesar de sobrepostos, os processos patológicos de ambos os fenótipos diferem, sugerindo que a neuroinflamação na forma progressiva é mais compartimentalizada no SNC, embora mais difusa dentro deste, em decorrência de uma maior ativação crônica de células da resposta imune inata (18, 136, 137). Mensurar o processo inflamatório nesse contexto representa um desafio pois a imagem de RM convencional não é capaz de captá-lo em sua totalidade sendo, portanto, importante a avaliação com diferentes técnicas de imagem para distinguir o perfil de cada paciente (17).

5.2. Imagem PET de processos patológicos relacionados à EM

O presente estudo foi o primeiro a combinar uma abordagem PET multi-traçador para investigar *in vivo* o perfil de células da resposta imune inata e o conteúdo de mielina no cérebro

de pacientes com EM e seus diferentes fenótipos clínicos. Embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas na captação de [^{11}C]PK11195 (V_T) a nível de VOI, um perfil de ativação difuso de células da resposta imune inata pode ser observado a nível de voxel, particularmente no grupo EMP. Adicionalmente, maior captação em diversos VOIs foi independentemente associado à maior incapacidade funcional. Adicionalmente, uma diminuição da captação de [^{11}C]PIB (DVR) foi observada no corpo caloso e nas lesões T2 demonstrando a marcada perda do conteúdo de mielina nessas regiões, também associada a pior desempenho funcional nas medidas de EDSS, 9HPT e SDMT.

Em caráter exploratório, diferenças na captação de ambos os radiofármacos foram analisadas dividindo os pacientes com base na atividade de doença e comprometimento cognitivo na inclusão, contudo nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada. De forma semelhante, não foram observadas diferenças entre os pacientes que apresentaram eventos clínicos significativos nos 12 meses de seguimento após a aquisição da imagem PET, diferindo de estudos anteriores utilizando PET TSPO (20, 21). Comparando com o estudo que demonstrou o potencial do PET TSPO em prever incapacidade a longo prazo, o nosso estudo apresentou um seguimento mais curto e, portanto, um menor número de eventos nos pacientes reavaliados. Nesse contexto, é possível que um tempo de seguimento mais longo da nossa própria amostra possa acrescentar informações interessantes sobre o potencial preditivo da imagem PET TSPO.

5.2.1. Ativação de células da resposta imune inata

Estudos prévios utilizando a imagem de PET TSPO sugerem que a ativação de células da resposta imune inata pode explicar parcialmente o acúmulo de incapacidade nos pacientes com EM, notadamente em fenótipos progressivos, indicando uma predominância de um perfil pró-inflamatório da micróglia neste subgrupo (22, 113, 114, 138). Embora não tenham sido observadas diferenças na captação de [^{11}C]PK11195 (V_T) entre controles saudáveis e pacientes ou entre os fenótipos de EM, a associação com maior incapacidade foi consistente em diversas das regiões avaliadas na nossa coorte. Alguns fatores podem justificar essa ausência de diferenças entre grupos, tais como o pequeno tamanho da amostra, a alta variabilidade interindividual no tocante ao perfil microglial, e a heterogeneidade da população. Por exemplo, nossa coorte incluiu pacientes com tratamentos heterogêneos, alguns sabidamente capazes de interferir na atividade da micróglia no SNC (139, 140), e mesmo considerando as características

de tratamento nas análises, é preciso ponderar que algumas nuances relacionadas às drogas modificadoras de doença podem não ser completamente apreendidas por abordagens estatísticas, ainda mais em um estudo com número reduzido de sujeitos.

Adicionalmente, a clássica análise de imagem baseada em VOI utilizada tem a limitação intrínseca de calcular a média de captação do radiofármaco dentro da região anatômica predefinida (volume de interesse), o que no contexto de ativação de células da resposta imune inata, tende a subestimar as pequenas alterações difusamente distribuídas nos tecidos como demonstrado nos estudos patológicos (2, 6). Por outro lado, a abordagem baseada em voxel, realizada no nosso estudo utilizando os mapas de [^{11}C]PK11195 (V_T) para a comparação dos fenótipos de EM e controles, foi capaz de demonstrar pontos de maior captação esparsos na SB, principalmente no fenótipo EMP. Esse achado corrobora a hipótese de que a ativação microglial é difusa, e provavelmente segue uma distribuição randômica à semelhança das lesões com hipersinal em T2 observadas nas imagens de RM convencional.

É sabido que a micróglia tem papéis variados dentro do SNC tanto no contexto homeostático quanto patológico, como por exemplo a poda de sinapses e limpeza de detritos de mielina, e esses papéis parecem variar inclusive dentro do mesmo paciente a depender da atividade e localização das lesões (58, 141, 142). Além disso, o espectro de ativação das células da resposta imune inata é amplo e dinâmico, não sendo mais cabível o conceito binário estrito de pró e anti-inflamatório. E, embora alterações no perfil das células que expressam TSPO tenham sido descritas em modelos animais e pacientes com EM, dando suporte ao uso desses traçadores (103, 104, 107), a diferenciação através da imagem molecular de um perfil mais pró-inflamatório da micróglia ainda não é factível. Portanto, não é possível afirmar através da imagem de PET TSPO que a micróglia observada está contribuindo para o processo inflamatório crônico ou tentando contrapor-se a ele.

Nesse contexto, é de fundamental importância interpretar os achados de PET TSPO a luz das medidas de incapacidade para melhor compreender o significado clínico da imagem molecular. De modo semelhante à nossa coorte, estudos anteriores demonstraram uma associação entre maior captação de traçadores TSPO em diversas regiões no cérebro de pacientes com EM e maior incapacidade, mais evidente em pacientes com doença progressiva (20-22, 74, 143). Esses dados contribuem para a hipótese de que o perfil de células da resposta imune inata mensurado pela imagem molecular pode decorrer da perda de homeostase e consequente manutenção do processo inflamatório crônico, quiescente e compartimentalizado no SNC. Embora mudanças no comportamento da micróglia sejam observadas desde estágios

iniciais da patologia da EM, estudos *ex vivo* sugerem que a perda generalizada do comportamento homeostático da micróglia está relacionada a idade e a duração da doença, fatores que podem explicar as nossas observações mais proeminentes na população de pacientes com EMP (9, 144, 145).

Dentre os desafios atuais na interpretação da imagem PET TSPO no contexto das doenças neurológicas, discute-se sobre a capacidade dos traçadores TSPO de mensurar de fato a ativação das células da resposta imune inata. Por exemplo, um recente estudo imunopatológico utilizando amostras de cérebros de pacientes com EM, detalhando criteriosamente o perfil transcricional da micróglia, demonstrou que a expressão de TSPO não está precisamente colocalizada com a micróglia ativada, nos fazendo questionar se a imagem TSPO do cérebro humano representa ativação ou puramente densidade de micróglia (108). Em paralelo, no nosso estudo não foram observadas diferenças na captação de [¹¹C]PK11195 (V_T) ou correlação entre os dois traçadores nas regiões com menor conteúdo de mielina, como no VOI de corpo caloso e no VOI de lesão T2. Uma vez que seria esperado uma maior presença de células microgliais em regiões de maior comprometimento patológico, fossem contribuindo para o dano tecidual ou auxiliando no reparo, uma hipótese a se considerar é que o maior dano tecidual nessas regiões possa ter levado a uma diminuição na densidade da micróglia e contribuído para ausência de diferenças expressivas de captação nessas regiões.

Ainda no tocante as lesões T2, não observamos diferenças na captação de [¹¹C]PK11195 (V_T) em relação a substância branca de aparência normal (SBAN) na nossa coorte, diferindo dos achados reportados por outros grupos (21, 22, 113, 138). Além da possibilidade discutida acima de considerar o traçador TSPO como uma medida de densidade de micróglia, e não de ativação, o dano tecidual e a heterogeneidade das lesões também precisam ser discutidos. Por exemplo, no nosso estudo o VOI de lesão T2 agrupou em uma única região de interesse todas as alterações de sinal T2 detectáveis na RM convencional, sendo então a média dos valores de todas as lesões de cada paciente utilizada para análise. Essa abordagem é semelhante a já utilizada por diversos grupos (125, 146), tendo em vista os desafios metodológicos para segmentar e analisar as lesões de forma individualizada, considerando o alto número e a confluência das lesões no decorrer da doença. Por exemplo, o paciente com fenótipo EMRR pode ter dezenas ou centenas de lesões que se acumulam ao longo da vida, culminando na maioria das vezes em uma alta carga lesional nos pacientes que evoluem para o fenótipo EMSP. Por outro lado, os pacientes com EMPP podem apresentar uma carga

de lesão T2 comparativamente menor, e agrupar esses pacientes dentro do fenótipo EMP pode ser um fator de confusão.

Além disso, essa abordagem não leva em consideração os diferentes estágios das lesões que vão desde lesões ativas com um número expressivo de células da resposta imune adaptativa até lesões crônicas inativas onde não é mais observado um franco processo inflamatório. Dentro da classificação patológica do padrão lesional, as chamadas lesões crônicas ativas (ou do inglês, *smoldering lesions*), marcadas por uma borda de microglia ativada, são mais frequentemente detectadas em fenótipos progressivos (67, 137, 147). Esse achado sugere que o perfil de células da resposta imune inata medido através do PET TSPO, seja em ativação ou em densidade de microglia, pode ser considerado um proxy de inflamação crônica do SNC e um potencial biomarcador de progressão de doença conforme descrito anteriormente por Sucksdorff et al. (21). Para além dos fenótipos progressivos, uma progressão silenciosa ou independente de surtos (PIRA – do inglês *progression independent of relapses*) tem sido observada em pacientes com EMRR, e estudos recentes demonstraram piora a longo prazo em pacientes sem atividade clínica ou radiológica à RM convencional (90-92). Portanto, é razoável considerar que estudos utilizando PET TSPO longitudinalmente podem adicionar informações valiosas sobre os pacientes em risco de transição para estágios progressivos da doença ou mesmo de PIRA durante a fase EMRR.

5.2.2. Conteúdo de mielina

Uma redução acentuada do conteúdo de mielina foi observada nas lesões T2 quando comparado à SBAN, de modo semelhante ao previamente reportado na literatura, e corroborando a aplicabilidade do PET PIB como uma imagem quantitativa de mielina (23-25, 148, 149). Em nossa coorte, uma maior desmielinização no VOI de lesão T2 foi associada a um EDSS mais alto, e um paralelo pode ser estabelecido com um estudo longitudinal prévio que demonstrou através de mapas de mielina individuais usando [¹¹C]PIB, uma correlação inversa entre o índice de remielinização e a incapacidade funcional (24). Adicionalmente, um baixo conteúdo de mielina no corpo caloso foi um fator preditor independente de pior pontuação no teste cognitivo SDMT, em consonância com achados descritos previamente por Abel et al. (150) usando uma técnica específica de imagem de RM (*myelin water fraction*) e por Campanholo e al.(151) usando razão de transferência de magnetização (do inglês, *Magnetization Transfer Ratio - MTR*).

A redução de mielina observada no corpo caloso, principalmente nos pacientes progressivos, provavelmente reflete um dano mais difuso neste subgrupo demonstrado por valores médios mais baixos de captação de [¹¹C]PIB a nível do VOI. A nível de voxel, diferenças no corpo caloso também foram observadas ao comparar saudáveis e pacientes com EMP, contudo estas diferenças não sobreviveram a correção de múltiplas comparações. Isso se deve possivelmente ao reduzido poder estatístico resultante do pequeno tamanho da amostra, bem como da heterogeneidade dentro da população EMP. Por exemplo, clusters em locais semelhantes foram observados em ambos os fenótipos de EM, o que pode ser explicado pela semelhança de carga de lesão no fenótipo EMRR e secundariamente progressivo (incluído no grupo EMP), com padrão predominantemente periventricular. Importante também considerar que a atrofia cerebral com conseqüente aumento do sistema ventricular é um achado comum na EMP, e o efeito de volume parcial deve ser cuidadosamente considerado antes de fazer suposições sobre uma verdadeira diminuição do conteúdo de mielina nessas regiões.

Vale ressaltar que o fenótipo EMRR também pode apresentar dano periventricular mensurável mesmo nos estágios iniciais, como demonstrado por Brown et al. (71) em um estudo longitudinal aplicando MTR. Os autores demonstraram um gradiente de anormalidade periventricular na SBAN de pacientes com EM inicial e esse achado foi clinicamente relevante e parcialmente independente da presença de lesões. Da mesma forma, Poirion et al. (74), usando MTR e PET TSPO, demonstraram um gradiente de dano microestrutural associado à neuroinflamação, evidenciando ainda uma associação entre o perfil microglial na região periventricular e pior incapacidade. Essas evidências, além de dar suporte a teoria de que fatores derivados do LCR podem contribuir para o processo inflamatório e comprometer a remielinização, sugerem que uma diminuição do conteúdo de mielina nas áreas periventriculares provavelmente está relacionada à incapacidade em todos os estágios da doença, devendo ser alvo terapêutico desde as fases clínicas iniciais.

É sabido que as áreas remielinizadas são mais preservadas em termos de integridade axonal, destacando o potencial papel neuroprotetor de se promover a remielinização. Apesar de repetidos esforços da comunidade científica, não existem até o momento terapias aprovadas capazes de induzir a regeneração do conteúdo de mielina. Estratégias terapêuticas inicialmente projetadas para remielinização, parecem ter também um efeito no perfil de células da resposta imune inata em modelos experimentais, destacando a necessidade de avaliar esses processos patológicos em combinação (152).

Ainda é importante ressaltar, que em estudos *post mortem* é descrito uma grande heterogeneidade entre as lesões em termos de conteúdo de mielina, sendo as chamadas placas sombra (do inglês, *shadow plaques*) mais difíceis de serem identificadas, uma vez que podem ser interpretadas como parcialmente remielinizada, ou lesões recém desmielinizadas. Nesse contexto, a avaliação concomitante do perfil microglial é crucial para esta distinção uma vez que serve de guia histopatológico para determinar se a lesão é ativa, crônica ativa ou inativa (153). Os desafios na definição desses processos patológicos *ex vivo* podem ser traduzidos na ausência de correlação ou interação significativa *in vivo* entre os dois marcadores dentro dos VOIs analisados em nossa coorte, sugerindo que esses processos podem ocorrer de forma independente ou não linear.

6. LIMITAÇÕES

O presente estudo tem algumas limitações, dentre elas o número de indivíduos excluídos após a aquisição do protocolo de imagens. A maioria das exclusões foi decorrente de alterações estruturais inesperadas, uma vez que a imagem de RM foi adquirida simultaneamente à imagem de PET, impedindo a exclusão prévia de indivíduos saudáveis com anormalidades desconhecidas. No entanto, esta desvantagem potencial do uso de um sistema híbrido de PET/RM pode ser mitigada através da aquisição de sequências de RM convencionais antes do início do PET e não deve impedir o uso desta valiosa abordagem combinada.

Outro ponto importante se refere a classificação fenotípica atual da EM, que agrupa fenótipos progressivos primários e secundários sob um único grupo. Essa abordagem é útil em ambientes clínicos, mas pode aumentar a incerteza dentro do grupo EMP, uma vez que pacientes primariamente progressivos e secundariamente progressivos diferem do ponto de vista de carga lesional à RM convencional. Embora nossa amostra seja notável por ter 19 pacientes com fenótipo progressivo, tivemos apenas 8 pacientes com EM primariamente progressiva, o que impede uma abordagem estatística desse subgrupo.

No tocante a ausência de diferenças significativas entre os grupos na análise baseada em VOI da imagem de PET TSPO, particularmente na SBAN como demonstrado por grupos anteriores [20, 48, 49], é preciso considerar a baixa sensibilidade e especificidade do [¹¹C]PK11195, que por se tratar de um traçador TSPO de primeira geração, apresenta uma menor razão sinal-ruído. Para aumentar a confiabilidade das medidas, o método padrão-ouro de quantificação foi aplicado, utilizando função de entrada arterial corrigida para metabólito, e contabilizando o volume de sangue como 5% do volume do tecido alvo, uma vez o marcador TSPO também tem o potencial de se ligar às células endoteliais e sanguíneas (154). Além disso, como anteriormente publicado pelo nosso grupo, não houve diferenças na taxa de metabolização entre controles saudáveis e pacientes com EM em nossa coorte, minimizando ocasionais erros de medição (101, 124). Vale ressaltar, que embora a quantificação utilizando sangue arterial seja mais precisa, a punção arterial é um procedimento invasivo e não realizado na rotina clínica. Assim, validações mais robustas de métodos alternativos de quantificação são desejáveis e já estão em andamento dentro do nosso grupo.

Além disso, considerações devem ser feitas sobre os desafios da quantificação de PET na ausência de tecido “livre de patologia” na EM. Por exemplo, a quantificação do PET PIB usando um algoritmo supervisionado que agrupa voxels de substância cinzenta cortical para usar como referência é uma ferramenta útil, mas pode dificultar parcialmente a detecção de desmielinização em estudos humanos. Por exemplo, a capacidade do PET PIB de detectar desmielinização cortical já foi demonstrado pelo nosso grupo em um modelo EAE de sagui

(102), contudo permanecem questões sobre o método de quantificação ideal em humanos para analisar o conteúdo de mielina cortical. Estratégias alternativas devem ser levadas em consideração, como mudar o tecido alvo para aplicar o algoritmo supervisionado para determinação da região de referência ao focar em áreas corticais. Além disso, a farmacocinética desses marcadores na SC cortical e profunda é um desafio adicional para interpretar a captação de [^{11}C]PIB em pacientes com EM, considerando o menor teor de mielina nas estruturas de SC profunda e a alta ligação no núcleo estriado e tálamo já descrita por outros grupos (155).

Por fim, a abordagem baseada em regiões anatômicas pré-definidas, não compreende totalmente a heterogeneidade da patologia da EM e análises que permitam correlacionar ou aplicar modelos de regressão a nível de voxel, podem revelar associações entre a captação de [^{11}C]PK11195 e [^{11}C]PIB, não evidenciadas no nosso estudo. Em particular, o VOI de lesão T2 englobando todas as lesões, não leva em consideração as nuances de cada lesão que em geral apresentam distintos padrões de micróglia e de perda de mielina a depender do estágio da lesão e do local estudado (centro, borda e tecido perilesional). Métodos mais avançados, considerando as lesões de forma individualizada podem contribuir para identificar uma assinatura específica de lesão predominante em cada indivíduo. Essa análise personalizada já está em andamento e tem o potencial de revelar diferenças sutis no padrão lesional entre os fenótipos, bem como dentre os diferentes perfis de incapacidade.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que um perfil difuso de células da resposta imune inata está associado à maior incapacidade e explica parcialmente a variância observada entre pacientes com EM. Além disso, maior incapacidade funcional também foi associada a uma diminuição acentuada de mielina nas regiões próximas aos ventrículos, como lesões T2 e corpo caloso. Foi observado ainda um pior desempenho cognitivo associado a maior neuroinflamação e menor conteúdo de mielina em corpo caloso, sendo este último independente do fenótipo clínico.

Não foram observadas diferenças significativas na captação de ambos os radiofármacos em relação a atividade de doença e comprometimento cognitivo na inclusão ou evento clínico nos 12 meses subsequentes à imagem PET. Adicionalmente, nenhuma associação foi observada entre o perfil de células da resposta imune inata e o conteúdo de mielina nas lesões T2 ou dentre as demais das regiões estudadas. Esses achados sugerem que cada processo patológico pode ocorrer de forma independente e contribuir para um perfil de incapacidade específico, resultando na heterogeneidade clínica observada em pacientes com EM.

8. PERSPECTIVAS

Apesar do grande progresso no tratamento da EM, há uma necessidade não atendida de abordagens terapêuticas mais direcionadas, o que atualmente depende sobretudo de parâmetros clínicos, que são em grande parte subjetivos. A heterogeneidade nos mecanismos patológicos e as diferenças imunes individuais determinam respostas distintas aos tratamentos disponíveis, e ainda não existem biomarcadores capazes de definir um perfil respondedor a priori. Considerando as associações relevantes entre os dados de imagem PET com traçadores específicos e o perfil de incapacidade, é provável que estudos adicionais possam contribuir para estabelecer padrões que auxiliem na tomada de decisão terapêutica a nível individual. Contudo, esforços estão, e devem continuar, direcionados para otimizar métodos de quantificação menos para que a técnica se torne reprodutível e factível na rotina clínica.

No contexto de ensaios clínicos, a análise focada em lesões individuais através da imagem PET tem o potencial de identificar *in vivo* a presença de lesões crônicas ativas, definidas por um centro desmielinizado e uma borda de micróglia ativada (142). Uma vez que uma maior prevalência dessas lesões está associada a um maior risco de progressão de incapacidade (156-158), identificá-las e monitorá-las a longo prazo pode auxiliar na predição de incapacidade a nível individual e é de suma importância para avaliação das terapias recentes com ação no braço da resposta imune inata. Ainda nesse contexto, novos traçadores capazes de identificar o fenótipo microglial bem como outros componentes relacionados à neuroinflamação compartimentalizada podem igualmente ampliar nosso entendimento do papel das células da glia no processo neurodegenerativo na EM (108, 159). Adicionalmente, embora ainda não se tenha resultados promissores de drogas remielinizantes, determinar a capacidade individual de remielinização pode também ajudar a identificar pacientes candidatos a novos estudos com drogas focadas em neuroproteção e reparação. Na era da medicina personalizada, é fundamental a busca e o estabelecimento de medidas objetivas que possam contribuir para otimizar o diagnóstico, estratificação e monitoramento da doença, buscando maximizar a eficácia e minimizar os riscos para a população que vive com EM.

9. REFERÊNCIAS

1. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2018;378(2):169-80.
2. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007;17(2):210-8.
3. Elkjaer ML, Frisch T, Reynolds R, Kacprowski T, Burton M, Kruse TA, et al. Molecular signature of different lesion types in the brain white matter of patients with progressive multiple sclerosis. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):205.
4. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2014;128(2):191-213.
5. Guerrero BL, Sicotte NL. Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Front Immunol*. 2020;11:374.
6. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
7. Hess K, Starost L, Kieran NW, Thomas C, Vincenten MCJ, Antel J, et al. Lesion stage-dependent causes for impaired remyelination in MS. *Acta Neuropathol*. 2020;140(3):359-75.
8. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*. 2014;211(8):1533-49.
9. Zrzavy T, Hametner S, Wimmer I, Butovsky O, Weiner HL, Lassmann H. Loss of 'homeostatic' microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(7):1900-13.
10. Gruchot J, Weyers V, Gottle P, Forster M, Hartung HP, Kury P, et al. The Molecular Basis for Remyelination Failure in Multiple Sclerosis. *Cells*. 2019;8(8).
11. Xing YL, Roth PT, Stratton JA, Chuang BH, Danne J, Ellis SL, et al. Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination. *J Neurosci*. 2014;34(42):14128-46.
12. Brousse B, Magalon K, Durbec P, Cayre M. Region and dynamic specificities of adult neural stem cells and oligodendrocyte precursors in myelin regeneration in the mouse brain. *Biol Open*. 2015;4(8):980-92.
13. Lloyd AF, Davies CL, Holloway RK, Labrak Y, Ireland G, Carradori D, et al. Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation. *Nat Neurosci*. 2019;22(7):1046-52.
14. De Biase LM, Schuebel KE, Fushfeld ZH, Jair K, Hawes IA, Cimbri R, et al. Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron*. 2017;95(2):341-56 e6.
15. Haider L, Simeonidou C, Steinberger G, Hametner S, Grigoriadis N, Deretzi G, et al. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014;85(12):1386-95.
16. Ontaneda D, Raza PC, Mahajan KR, Arnold DL, Dwyer MG, Gauthier SA, et al. Deep grey matter injury in multiple sclerosis: a NAIMS consensus statement. *Brain*. 2021;144(7):1974-84.
17. Tommasin S, Gianni C, De Giglio L, Pantano P. Neuroimaging Techniques to Assess Inflammation in Multiple Sclerosis. *Neuroscience*. 2019;403:4-16.

18. Matthews PM. Chronic inflammation in multiple sclerosis - seeing what was always there. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(10):582-93.
19. Ghadery C, Best LA, Pavese N, Tai YF, Strafella AP. PET Evaluation of Microglial Activation in Non-neurodegenerative Brain Diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2019;19(7):38.
20. Bodini B, Poirion E, Tonietto M, Benoit C, Palladino R, Maillart E, et al. Individual Mapping of Innate Immune Cell Activation Is a Candidate Marker of Patient-Specific Trajectories of Worsening Disability in Multiple Sclerosis. *J Nucl Med*. 2020;61(7):1043-9.
21. Sucksdorff M, Matilainen M, Tuisku J, Polvinen E, Vuorimaa A, Rokka J, et al. Brain TSPO-PET predicts later disease progression independent of relapses in multiple sclerosis. *Brain*. 2020;143(11):3318-30.
22. Rissanen E, Tuisku J, Rokka J, Paavilainen T, Parkkola R, Rinne JO, et al. In Vivo Detection of Diffuse Inflammation in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Using PET Imaging and the Radioligand (1)(1)C-PK11195. *J Nucl Med*. 2014;55(6):939-44.
23. Stankoff B, Freeman L, Aigrot MS, Chardain A, Dolle F, Williams A, et al. Imaging central nervous system myelin by positron emission tomography in multiple sclerosis using [methyl-(1)(1)C]-2-(4'-methylaminophenyl)-6-hydroxybenzothiazole. *Ann Neurol*. 2011;69(4):673-80.
24. Bodini B, Veronese M, Garcia-Lorenzo D, Battaglini M, Poirion E, Chardain A, et al. Dynamic Imaging of Individual Remyelination Profiles in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol*. 2016;79(5):726-38.
25. Zeydan B, Schwarz CG, Lowe VJ, Reid RI, Przybelski SA, Lesnick TG, et al. Investigation of white matter PiB uptake as a marker of white matter integrity. *Ann Clin Transl Neurol*. 2019;6(4):678-88.
26. Pitombeira MS, Koole M, Campanholo KR, Souza AM, Duran FLS, Solla DJF, et al. Innate immune cells and myelin profile in multiple sclerosis: a multi-tracer PET/MR study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2022.
27. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol*. 2016;36(2):103-14.
28. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-58.
29. Kobelt G, Thompson A, Berg J, Gannedahl M, Eriksson J, Group MS, et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. *Mult Scler*. 2017;23(8):1123-36.
30. Lunde HMB, Assmus J, Myhr KM, Bo L, Grytten N. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2017;88(8):621-5.
31. Rivera VM. Multiple Sclerosis in Latin Americans: Genetic Aspects. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17(8):57.
32. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA, et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand*. 2001 Oct;104(4):208-13.

33. Callegaro D, de Lolio CA, Radvany J, Tilbery CP, Mendonça RA, Melo AC. Prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, in 1990. *Neuroepidemiology*. 1992;11(1):11-4.
34. Grytten N, Torkildsen O, Myhr KM. Time trends in the incidence and prevalence of multiple sclerosis in Norway during eight decades. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(199):29-36.
35. da Gama Pereira AB, Sampaio Lacativa MC, da Costa Pereira FF, Papais Alvarenga RM. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2015 Nov;4(6):572-9.
36. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Nat Rev Microbiol*. 2022.
37. Vasconcelos CC, Thuler LC, Rodrigues BC, Calmon AB, Alvarenga RM. Multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Clin Neurol Neurosurg*. 2016;151:24-30.
38. Correale J, Farez MF, Gaitan MI. Environmental factors influencing multiple sclerosis in Latin America. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2017;3(2):2055217317715049.
39. Kaisey M, Solomon AJ, Luu M, Giesser BS, Sicotte NL. Incidence of multiple sclerosis misdiagnosis in referrals to two academic centers. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;30:51-6.
40. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
41. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.
42. Filippi M, Preziosa P, Meani A, Ciccarelli O, Mesaros S, Rovira A, et al. Prediction of a multiple sclerosis diagnosis in patients with clinically isolated syndrome using the 2016 MAGNIMS and 2010 McDonald criteria: a retrospective study. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):133-42.
43. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *The Lancet Neurology*. 2016;15(3):292-303.
44. Wattjes MP, Rovira A, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, de Stefano MP, et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis--establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol*. 2015;11(10):597-606.
45. Tintore M, Rovira A, Rio J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C, et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain*. 2015;138(Pt 7):1863-74.
46. Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain*. 2006;129(Pt 3):606-16.
47. Lublin FD. New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol*. 2014;72 Suppl 1:1-5.
48. Damasceno A, Damasceno BP, Cendes F. No evidence of disease activity in multiple sclerosis: Implications on cognition and brain atrophy. *Mult Scler*. 2016;22(1):64-72.

49. D'Amico E, Patti F, Zanghi A, Zappia M. A Personalized Approach in Progressive Multiple Sclerosis: The Current Status of Disease Modifying Therapies (DMTs) and Future Perspectives. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10).
50. Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol.* 2015;127-128:1-22.
51. Engelhardt B, Comabella M, Chan A. Multiple sclerosis: Immunopathological heterogeneity and its implications. *Eur J Immunol.* 2022;52(6):869-81.
52. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133(2):223-44.
53. Fransen NL, Hsiao CC, van der Poel M, Engelenburg HJ, Verdaasdonk K, Vincenten MCJ, et al. Tissue-resident memory T cells invade the brain parenchyma in multiple sclerosis white matter lesions. *Brain.* 2020;143(6):1714-30.
54. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):221-34.
55. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017;376(3):209-20.
56. Castillo-Trivino T, Braithwaite D, Bacchetti P, Waubant E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PLoS One.* 2013;8(7):e66308.
57. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol.* 2015;6:636.
58. Plastini MJ, Desu HL, Brambilla R. Dynamic Responses of Microglia in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:269.
59. Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;8(1):a020560.
60. Abdelhak A, Weber MS, Tumani H. Primary Progressive Multiple Sclerosis: Putting Together the Puzzle. *Front Neurol.* 2017;8:234.
61. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2013 Aug;19(4 Multiple Sclerosis):901-21.
62. Junker A, Wozniak J, Voigt D, Scheidt U, Antel J, Wegner C, et al. Extensive subpial cortical demyelination is specific to multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2020;30(3):641-52.
63. Pikor NB, Prat A, Bar-Or A, Gommerman JL. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front Immunol.* 2015;6:657.
64. Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 2009;462(7269):94-8.
65. Maggi P, Absinta M, Sati P, Perrotta G, Massacesi L, Dachy B, et al. The "central vein sign" in patients with diagnostic "red flags" for multiple sclerosis: A prospective multicenter 3T study. *Mult Scler.* 2019:1352458519876031.
66. Dal-Bianco A, Grabner G, Kronnerwetter C, Weber M, Kornek B, Kasprian G, et al. Long-term evolution of multiple sclerosis iron rim lesions in 7 T MRI. *Brain.* 2021.

67. Kaunzner UW, Kang Y, Zhang S, Morris E, Yao Y, Pandya S, et al. Quantitative susceptibility mapping identifies inflammation in a subset of chronic multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2019;142(1):133-45.
68. Pokryszko-Dragan A, Banaszek A, Nowakowska-Kotas M, Jezowska-Jurczyk K, Dziadkowiak E, Gruszka E, et al. Diffusion tensor imaging findings in the multiple sclerosis patients and their relationships to various aspects of disability. *J Neurol Sci*. 2018;391:127-33.
69. Klistorner A, Wang C, Yiannikas C, Parratt J, Dwyer M, Barton J, et al. Evidence of progressive tissue loss in the core of chronic MS lesions: A longitudinal DTI study. *Neuroimage Clin*. 2018;17:1028-35.
70. Rissanen E, Tuisku J, Vahlberg T, Sucksdorff M, Paavilainen T, Parkkola R, et al. Microglial activation, white matter tract damage, and disability in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(3):e443.
71. Brown JW, Pardini M, Brownlee WJ, Fernando K, Samson RS, Prados Carrasco F, et al. An abnormal periventricular magnetization transfer ratio gradient occurs early in multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(2):387-98.
72. Heath F, Hurley SA, Johansen-Berg H, Sampaio-Baptista C. Advances in noninvasive myelin imaging. *Dev Neurobiol*. 2018;78(2):136-51.
73. Varma G, Duhamel G, de Bazelaire C, Alsop DC. Magnetization transfer from inhomogeneously broadened lines: A potential marker for myelin. *Magn Reson Med*. 2015;73(2):614-22.
74. Poirion E, Tonietto M, Lejeune FX, Ricigliano VAG, Boudot de la Motte M, Benoit C, et al. Structural and Clinical Correlates of a Periventricular Gradient of Neuroinflammation in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2021;96(14):e1865-e75.
75. Sastre-Garriga J, Pareto D, Battaglini M, Rocca MA, Ciccarelli O, Enzinger C, et al. MAGNIMS consensus recommendations on the use of brain and spinal cord atrophy measures in clinical practice. *Nat Rev Neurol*. 2020;16(3):171-82.
76. Scalfari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013 Jul 9;81(2):184-92.
77. Lorscheider J, Buzzard K, Jokubaitis V, Spelman T, Havrdova E, Horakova D, et al. Defining secondary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2016;139(Pt 9):2395-405.
78. Filippi M, Preziosa P, Langdon D, Lassmann H, Paul F, Rovira A, et al. Identifying Progression in Multiple Sclerosis: New Perspectives. *Ann Neurol*. 2020;88(3):438-52.
79. Zhang J, Waubant E, Cutter G, Wolinsky J, Leppert D. Composite end points to assess delay of disability progression by MS treatments. *Mult Scler*. 2014;20(11):1494-501.
80. Cree BAC, Arnold DL, Chataway J, Chitnis T, Fox RJ, Pozo Ramajo A, et al. Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights. *Neurology*. 2021;97(8):378-88.
81. Cadavid D, Cohen JA, Freedman MS, Goldman MD, Hartung HP, Havrdova E, et al. The EDSS-Plus, an improved endpoint for disability progression in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(1):94-105.
82. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
83. Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A, Rice GP, Muraro PA, Daumer M, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain*. 2010;133(Pt 7):1914-29.

84. Ciotti JR, Cross AH. Disease-Modifying Treatment in Progressive Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol*. 2018;20(5):12.
85. Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(1):53-8.
86. Bin Sawad A, Seoane-Vazquez E, Rodriguez-Monguio R, Turkistani F. Evaluation of the Expanded Disability Status Scale and the Multiple Sclerosis Functional Composite as clinical endpoints in multiple sclerosis clinical trials: quantitative meta-analyses. *Curr Med Res Opin*. 2016;32(12):1969-74.
87. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. National MS Society Clinical Outcomes Assessment Task Force. *Mult Scler*. 1999;5(4):244-50.
88. Tilbery CP MM, Thomaz RB, Oliveira BE, Kelian GL, Busch R, Miranda PP, Caleffi P. Multiple Sclerosis Functional Composite Measure (MSFC) standardized in the Brazilian population. *Arq Neuropsiquiatr*. 2005;63:6.
89. Benedict RH, DeLuca J, Phillips G, LaRocca N, Hudson LD, Rudick R, et al. Validity of the Symbol Digit Modalities Test as a cognition performance outcome measure for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2017;23(5):721-33.
90. University of California SFMSET, Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, et al. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2019;85(5):653-66.
91. Lublin FD, Haring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Cuklina J, et al. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain*. 2022.
92. Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, et al. Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol*. 2020;77(9):1132-40.
93. Sormani MP, Rio J, Tintore M, Signori A, Li D, Cornelisse P, et al. Scoring treatment response in patients with relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2013;19(5):605-12.
94. Reich DS. Imag(in)ing multiple sclerosis: Time to take better pictures. *J Neuroimmunol*. 2017;304:72-80.
95. Louapre C, Bodini B, Lubetzki C, Freeman L, Stankoff B. Imaging markers of multiple sclerosis prognosis. *Curr Opin Neurol*. 2017;30(3):231-6.
96. Bonacchi R, Pagani E, Meani A, Cacciaguerra L, Preziosa P, De Meo E, et al. Clinical Relevance of Multiparametric MRI Assessment of Cervical Cord Damage in Multiple Sclerosis. *Radiology*. 2020;296(3):605-15.
97. Rocca MA, Valsasina P, Meani A, Gobbi C, Zecca C, Rovira A, et al. Association of Gray Matter Atrophy Patterns with Clinical Phenotype and Progression in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 2021.
98. Oh J, Ontaneda D, Azevedo C, Klawiter EC, Absinta M, Arnold DL, et al. Imaging outcome measures of neuroprotection and repair in MS: A consensus statement from NAIMS. *Neurology*. 2019;92(11):519-33.

99. Van Obberghen E, McHinda S, le Troter A, Prevost VH, Viout P, Guye M, et al. Evaluation of the Sensitivity of Inhomogeneous Magnetization Transfer (ihMT) MRI for Multiple Sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2018;39(4):634-41.
100. Moccia M, de Stefano N, Barkhof F. Imaging outcome measures for progressive multiple sclerosis trials. *Mult Scler*. 2017;23(12):1614-26.
101. Turkheimer FE, Rizzo G, Bloomfield PS, Howes O, Zanotti-Fregonara P, Bertoldo A, et al. The methodology of TSPO imaging with positron emission tomography. *Biochem Soc Trans*. 2015;43(4):586-92.
102. Carvalho RHF, Real CC, Cinini S, Garcez AT, Duran FLS, Marques FLN, et al. [(11)C]PIB PET imaging can detect white and grey matter demyelination in a non-human primate model of progressive multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2019;35:108-15.
103. de Paula Faria D, Vlaming ML, Copray SC, Tielen F, Anthonijsz HJ, Sijbesma JW, et al. PET imaging of disease progression and treatment effects in the experimental autoimmune encephalomyelitis rat model. *J Nucl Med*. 2014;55(8):1330-5.
104. de Paula Faria D, de Vries EF, Sijbesma JW, Buchpiguel CA, Dierckx RA, Copray SC. PET imaging of glucose metabolism, neuroinflammation and demyelination in the lysolecithin rat model for multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(11):1443-52.
105. Bauckneht M, Capitanio S, Raffa S, Roccatagliata L, Pardini M, Lapucci C, et al. Molecular imaging of multiple sclerosis: from the clinical demand to novel radiotracers. *EJNMMI Radiopharm Chem*. 2019;4(1):6.
106. Airas L, Nylund M, Rissanen E. Evaluation of Microglial Activation in Multiple Sclerosis Patients Using Positron Emission Tomography. *Front Neurol*. 2018;9:181.
107. Nutma E, Stephenson JA, Gorter RP, de Bruin J, Boucherie DM, Donat CK, et al. A quantitative neuropathological assessment of translocator protein expression in multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142(11):3440-55.
108. Nutma E, Gebro E, Marzin MC, van der Valk P, Matthews PM, Owen DR, et al. Activated microglia do not increase 18 kDa translocator protein (TSPO) expression in the multiple sclerosis brain. *Glia*. 2021.
109. Ransohoff RM, Schafer D, Vincent A, Blachere NE, Bar-Or A. Neuroinflammation: Ways in Which the Immune System Affects the Brain. *Neurotherapeutics*. 2015;12(4):896-909.
110. Airas L, Rissanen E, Rinne JO. Imaging neuroinflammation in multiple sclerosis using TSPO-PET. *Clin Transl Imaging*. 2015;3:461-73.
111. Schuitemaker A, van Berckel BN, Kropholler MA, Veltman DJ, Scheltens P, Jonker C, et al. SPM analysis of parametric (R)-[11C]PK11195 binding images: plasma input versus reference tissue parametric methods. *Neuroimage*. 2007;35(4):1473-9.
112. Unterrainer M, Mahler C, Vomacka L, Lindner S, Havla J, Brendel M, et al. TSPO PET with [(18)F]GE-180 sensitively detects focal neuroinflammation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45(8):1423-31.
113. Giannetti P, Politis M, Su P, Turkheimer FE, Malik O, Keihaninejad S, et al. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain*. 2015;138(Pt 1):110-9.
114. Herranz E, Louapre C, Treaba CA, Govindarajan ST, Ouellette R, Mangeat G, et al. Profiles of cortical inflammation in multiple sclerosis by (11)C-PBR28 MR-PET and 7 Tesla imaging. *Mult Scler*. 2019:1352458519867320.

115. Datta G, Colasanti A, Rabiner EA, Gunn RN, Malik O, Ciccarelli O, et al. Neuroinflammation and its relationship to changes in brain volume and white matter lesions in multiple sclerosis. *Brain*. 2017;140(11):2927-38.
116. Kaunzner UW, Kang Y, Monohan E, Kothari PJ, Nealon N, Perumal J, et al. Reduction of PK11195 uptake observed in multiple sclerosis lesions after natalizumab initiation. *Mult Scler Relat Disord*. 2017;15:27-33.
117. Morbelli S, Bauckneht M, Capitanio S, Pardini M, Roccatagliata L, Nobili F. A new frontier for amyloid PET imaging: multiple sclerosis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2019;46(2):276-9.
118. Zeydan B, Lowe VJ, Schwarz CG, Przybelski SA, Tosakulwong N, Zuk SM, et al. Pittsburgh compound-B PET white matter imaging and cognitive function in late multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2018;24(6):739-49.
119. Sepulcre J, Vanotti S, Hernández R, Sandoval G, Cáceres F, Garcea O, et al. Cognitive impairment in patients with multiple sclerosis using the Brief Repeatable Battery-Neuropsychology test. *Mult Scler*. 2006;12(2):187-95.
120. Damasceno A, Amaral J, Barreira AA, Becker J, Callegaro D, Campanholo KR, et al. Normative values of the Brief Repeatable Battery of Neuropsychological Tests in a Brazilian population sample: discrete and regression-based norms. *Arq Neuropsiquiatr*. 2018;76(3):163-9.
121. Sekine T, Burgos N, Warnock G, Huellner M, Buck A, Ter Voert EE, et al. Multi-Atlas-Based Attenuation Correction for Brain 18F-FDG PET Imaging Using a Time-of-Flight PET/MR Scanner: Comparison with Clinical Single-Atlas- and CT-Based Attenuation Correction. *J Nucl Med*. 2016;57(8):1258-64.
122. Nuttall G, Burckhardt J, Hadley A, Kane S, Kor D, Marienau MS, et al. Surgical and Patient Risk Factors for Severe Arterial Line Complications in Adults. *Anesthesiology*. 2016;124(3):590-7.
123. Berg K, Riesenberger LA, Berg D, Schaeffer A, Davis J, Justice EM, et al. The development of a validated checklist for radial arterial line placement: preliminary results. *Am J Med Qual*. 2014;29(3):242-6.
124. de Souza AM, Pitombeira MS, de Souza LE, Marques FLN, Buchpiguel CA, Real CC, et al. (11)C-PK11195 plasma metabolization has the same rate in multiple sclerosis patients and healthy controls: a cross-sectional study. *Neural Regen Res*. 2021;16(12):2494-8.
125. Schmidt P, Gaser C, Arsic M, Buck D, Forschler A, Berthele A, et al. An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *Neuroimage*. 2012;59(4):3774-83.
126. Ikoma Y, Edison P, Ramlackhansingh A, Brooks DJ, Turkheimer FE. Reference region automatic extraction in dynamic [(11)C]PIB. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(11):1725-31.
127. Veronese M, Bodini B, Garcia-Lorenzo D, Battaglini M, Bongarzone S, Comtat C, et al. Quantification of [(11)C]PIB PET for imaging myelin in the human brain: a test-retest reproducibility study in high-resolution research tomography. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2015;35(11):1771-82.
128. Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. *Neuroimage*. 2007;38(1):95-113.

129. Preziosa P, Rocca MA, Pagani E, Stromillo ML, Enzinger C, Gallo A, et al. Structural MRI correlates of cognitive impairment in patients with multiple sclerosis: A Multicenter Study. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(4):1627-44.
130. Popescu V, Klaver R, Versteeg A, Voorn P, Twisk JW, Barkhof F, et al. Postmortem validation of MRI cortical volume measurements in MS. *Hum Brain Mapp.* 2016;37(6):2223-33.
131. Zeydan B, Gu X, Atkinson EJ, Keegan BM, Weinshenker BG, Tillema JM, et al. Cervical spinal cord atrophy: An early marker of progressive MS onset. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5(2):e435.
132. Eshaghi A, Marinescu RV, Young AL, Firth NC, Prados F, Jorge Cardoso M, et al. Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis. *Brain.* 2018;141(6):1665-77.
133. Amiri H, de Sitter A, Bendfeldt K, Battaglini M, Gandini Wheeler-Kingshott CAM, Calabrese M, et al. Urgent challenges in quantification and interpretation of brain grey matter atrophy in individual MS patients using MRI. *Neuroimage Clin.* 2018;19:466-75.
134. Eijlers AJC, van Geest Q, Dekker I, Steenwijk MD, Meijer KA, Hulst HE, et al. Predicting cognitive decline in multiple sclerosis: a 5-year follow-up study. *Brain.* 2018;141(9):2605-18.
135. Kolber P, Droby A, Roebroek A, Goebel R, Fleischer V, Groppa S, et al. A "kissing lesion": In-vivo 7T evidence of meningeal inflammation in early multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(8):1167-9.
136. Dubbelaar ML, Kracht L, Eggen BJL, Boddeke E. The Kaleidoscope of Microglial Phenotypes. *Front Immunol.* 2018;9:1753.
137. Jackle K, Zeis T, Schaeren-Wiemers N, Junker A, van der Meer F, Kramann N, et al. Molecular signature of slowly expanding lesions in progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2020;143(7):2073-88.
138. Politis M GP, Su P, Turkheimer F, Keihaninejad S, Wu K, Waldman A, Malik O, Matthews PM, Reynolds R, Nicholas R, Piccini P. Increased PK11195 PET binding in the cortex of patients with MS correlates with disability. *Neurology.* 2012;79(6):523-30.
139. Sucksdorff M, Rissanen E, Tuisku J, Nuutinen S, Paavilainen T, Rokka J, et al. Evaluation of the Effect of Fingolimod Treatment on Microglial Activation Using Serial PET Imaging in Multiple Sclerosis. *J Nucl Med.* 2017;58(10):1646-51.
140. Vallez Garcia D, Doorduyn J, de Paula Faria D, Dierckx R, de Vries EFJ. Effect of Preventive and Curative Fingolimod Treatment Regimens on Microglia Activation and Disease Progression in a Rat Model of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2017;12(3):521-30.
141. Hagemeyer N, Hanft KM, Akritidou MA, Unger N, Park ES, Stanley ER, et al. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol.* 2017;134(3):441-58.
142. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Bruck W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.* 2017;133(1):13-24.
143. Datta G, Violante IR, Scott G, Zimmerman K, Santos-Ribeiro A, Rabiner EA, et al. Translocator positron-emission tomography and magnetic resonance spectroscopic imaging of brain glial cell activation in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(11):1469-78.

144. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1175-89.
145. Raj D, Yin Z, Breur M, Doorduyn J, Holtman IR, Olah M, et al. Increased White Matter Inflammation in Aging- and Alzheimer's Disease Brain. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:206.
146. Weeda MM, Brouwer I, de Vos ML, de Vries MS, Barkhof F, Pouwels PJW, et al. Comparing lesion segmentation methods in multiple sclerosis: Input from one manually delineated subject is sufficient for accurate lesion segmentation. *Neuroimage Clin*. 2019;24:102074.
147. Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol*. 2015;78(5):710-21.
148. O'Muircheartaigh J, Vavasour I, Ljungberg E, Li DKB, Rauscher A, Levesque V, et al. Quantitative neuroimaging measures of myelin in the healthy brain and in multiple sclerosis. *Hum Brain Mapp*. 2019;40(7):2104-16.
149. Stankoff B, Poirion E, Tonietto M, Bodini B. Exploring the heterogeneity of MS lesions using positron emission tomography: a reappraisal of their contribution to disability. *Brain Pathol*. 2018;28(5):723-34.
150. Abel S, Vavasour I, Lee LE, Johnson P, Ristow S, Ackermans N, et al. Associations Between Findings From Myelin Water Imaging and Cognitive Performance Among Individuals With Multiple Sclerosis. *JAMA Netw Open*. 2020;3(9):e2014220.
151. Campanholo KR, Pitombeira MS, Rimkus CM, Mendes MF, Apostolos-Pereira SL, Busatto Filho G, et al. Myelin imaging measures as predictors of cognitive impairment in MS patients: A hybrid PET-MRI study. *Mult Scler Relat Disord*. 2022;57:103331.
152. Lloyd AF, Miron VE. The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(8):447-58.
153. Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *The Lancet Neurology*. 2020;19(8):678-88.
154. Rizzo G, Veronese M, Tonietto M, Bodini B, Stankoff B, Wimberley C, et al. Generalization of endothelial modelling of TSPO PET imaging: Considerations on tracer affinities. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2019;39(5):874-85.
155. Li Y, Rinne JO, Mosconi L, Pirraglia E, Rusinek H, DeSanti S, et al. Regional analysis of FDG and PIB-PET images in normal aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(12):2169-81.
156. Elliott C, Belachew S, Wolinsky JS, Hauser SL, Kappos L, Barkhof F, et al. Chronic white matter lesion activity predicts clinical progression in primary progressive multiple sclerosis. *Brain*. 2019;142(9):2787-99.
157. Calvi A, Tur C, Chard D, Stutters J, Ciccarelli O, Cortese R, et al. Slowly expanding lesions relate to persisting black-holes and clinical outcomes in relapse-onset multiple sclerosis. *Neuroimage Clin*. 2022;35:103048.
158. Preziosa P, Pagani E, Meani A, Moiola L, Rodegher M, Filippi M, et al. Slowly Expanding Lesions Predict 9-Year Multiple Sclerosis Disease Progression. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2022;9(2).

159. Jain P, Chaney AM, Carlson ML, Jackson IM, Rao A, James ML. Neuroinflammation PET Imaging: Current Opinion and Future Directions. *J Nucl Med.* 2020;61(8):1107-12.

ANEXOS

ANEXO 1 – Publicação dos resultados Revistas científicas

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging
<https://doi.org/10.1007/s00259-022-05899-2>

ORIGINAL ARTICLE



Innate immune cells and myelin profile in multiple sclerosis: a multi-tracer PET/MR study

Milena Sales Pitombeira^{1,2} · Michel Koole³ · Kenia R. Campanholo^{1,2} · Aline M. Souza² · Fábio L. S. Duran⁴ ·
Davi J. Fontoura Solla⁵ · Maria F. Mendes¹ · Samira L. Apóstolos Pereira¹ · Carolina M. Rimkus⁶ ·
Geraldo Filho Busatto⁴ · Dagoberto Callegaro¹ · Carlos A. Buchpiguel² · Daniele de Paula Faria²

Received: 2 December 2021 / Accepted: 30 June 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

Purpose Neuropathological studies have demonstrated distinct profiles of microglia activation and myelin injury among different multiple sclerosis (MS) phenotypes and disability stages. PET imaging using specific tracers may uncover the in vivo molecular pathology and broaden the understanding of the disease heterogeneity.

ARTICLE IN PRESS

Multiple Sclerosis and Related Disorders xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Multiple Sclerosis and Related Disorders

journal homepage: www.elsevier.com/locate/msard



Original Research

Myelin imaging measures as predictors of cognitive impairment in MS patients: A hybrid PET-MRI study

KR Campanholo^{a,b,#}, MS Pitombeira^{a,b,#}, CM Rimkus^c, MF Mendes^b, SL Apóstolos-Pereira^b,
G Busatto Filho^d, D Callegaro^b, CA Buchpiguel^{a,c}, FLS Duran^d, D De Paula Faria^{a,*}

^a Laboratory of Nuclear Medicine (LIM43), Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

^b Department of Neurology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

^c Department of Radiology and Oncology Institute, Hospital das Clinicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

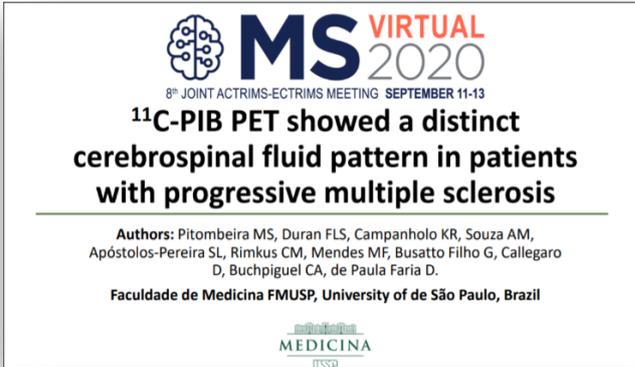
^d Laboratory of Psychiatric Neuroimaging (LIM 21), Department of Psychiatry, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, Brazil

Eventos científicos

2021



2020





**ACADEMIA
BRASILEIRA
DE NEUROLOGIA**



NEURODC-19
CONVENÇÃO NACIONAL DOS DEPARTAMENTOS CIENTÍFICOS DA ABN




Certificamos que
Milena Sales Pitombeira

participou com a apresentação oral do trabalho **PET IMAGING OF NEUROINFLAMMATION AND COGNITIVE ASSESSMENT IN RELAPSING-REMITTING MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS WITH MILD DISABILITY**, tendo como coautoras: Kenia Campanholo, Fábio Souza Duran, Aline de Souza, Samira Apóstolos-Pereira, Carolina Rimkus, Maria Fernanda Mendes, Geraldo Busatto Filho, Dagoberto Callegaro, Carlos Alberto Buchpiguel, Daniele de Paula Faria., trabalho aceito pelo Departamento Científico de Neuroimunologia da ABN, para o **NEURODC19**, realizado nos dias 1 a 4 de agosto de 2019, no Royal Palm Hall, na cidade de Campinas-SP



Dr. Ricardo Nitirini
DIRETOR CIENTÍFICO
NEURODC19



Dr. Gilmar Fernandes do Prado
PRESIDENTE
ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA



**MS VIRTUAL
2020**

8^o JOINT ACTRIMS-ECTRIMS MEETING: SEPTEMBER 11-13

**¹¹C-PIB PET showed a distinct
cerebrospinal fluid pattern in patients
with progressive multiple sclerosis**

Authors: Pitombeira MS, Duran FLS, Campanholo KR, Souza AM, Apóstolos-Pereira SL, Rimkus CM, Mendes MF, Busatto Filho G, Callegaro D, Buchpiguel CA, de Paula Faria D.

Faculdade de Medicina FMUSP, University of de São Paulo, Brazil



MEDICINA
USP

ANEXO 2 – Aprovação da CAPPesq



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Imagem PET em processos relacionados à doença esclerose múltipla

Pesquisador: Carlos Alberto Buchpiguel

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30202314.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA EDUCACAO
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.451.027

Apresentação do Projeto:

Projeto que visa estudar alterações na Tomografia de Emissão de Pósitrons em pacientes com esclerose múltipla.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar pacientes com esclerose múltipla por PET.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem alterações em relação ao projeto original.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda ao projeto original acrescentando avaliações neuropsicológicas e acrescentando pesquisadoras ao projeto inicial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira César

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.451.027

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_978777 E2.pdf	11/10/2017 17:51:20		Aceito
Outros	Carta_justificativa.pdf	11/10/2017 17:49:14	Carlos Alberto Buchpiquel	Aceito
Outros	Emenda2formulario.pdf	11/10/2017 17:45:50	Carlos Alberto Buchpiquel	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_atualizado_emeda2.pdf	11/10/2017 17:42:08	Carlos Alberto Buchpiquel	Aceito
Outros	Emenda.pdf	25/08/2016 15:45:17	Carlos Alberto Buchpiquel	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	21/10/2014 11:01:34		Aceito
Outros	Resposta parecer ético CAPPesq.pdf	19/05/2014 12:00:37		Aceito
Outros	Cadastro online assinado.pdf	07/04/2014 14:10:36		Aceito
Outros	Tradução Carta UMCG.pdf	17/03/2014 09:18:36		Aceito
Outros	Carta Universidade de Groningen.pdf	17/03/2014 09:18:06		Aceito
Outros	Plano de Trabalho PVE A015_2013 enviado.docx	11/03/2014 16:58:32		Aceito
Outros	Auxilio financeiro CAPES.pdf	11/03/2014 16:55:39		Aceito
Outros	Aprovação departamento.pdf	11/03/2014 16:55:03		Aceito
Outros	Ofício 015_2013.pdf	11/03/2014 16:15:51		Aceito

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.451.027

Outros	Anuência Neuro.PET.0002[1].pdf	11/03/2014 16:11:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Ciencia sem fronteiras traduzido CEP1.docx	11/03/2014 16:10:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_consentimento.pdf	11/03/2014 16:08:22		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Joel Faintuch
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

1. Título da pesquisa - **IMAGEM PET EM PROCESSOS RELACIONADOS À DOENÇA ESCLEROSE MÚLTIPLA**
2. Pesquisador principal - **Carlos Alberto Buchpiguel**
3. Departamento/Instituto - **Faculdade de Medicina – Centro de Medicina Nuclear**

1. Convite à participação

Convidamos o(a) Sr(a). a participar desta pesquisa para avaliar exames de imagem PET (tomografia por emissão de pósitron) e os diferentes graus de inflamação e degeneração na esclerose múltipla.

2. Justificativa e objetivos do estudo

Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária nesse estudo que pretende avaliar o exame de imagem PET para identificar inflamação e perda de mielina nos diferentes tipos de esclerose múltipla. Imagem PET pode tornar-se um instrumento mais preciso para avaliação da progressão da doença e também resposta do tratamento

3. Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados

Você fará um exame que avalia o cérebro e a medula espinhal chamado ressonância magnética estrutural. Nesse exame você deitará numa espécie de cama que se move lentamente dentro de um tubo largo, que faz parte do equipamento. Após iniciado o exame para registrar as imagens do cérebro e medula espinhal, você deverá manter a cabeça e as costas imóveis dentro do tubo. Durante o exame você ouvirá em alguns momentos barulho forte que indicam que o equipamento está funcionando. Enquanto você estiver deitada dentro da máquina, poderá se comunicar conosco e, se for necessário, interromperemos o exame para que você possa sair do equipamento. É provável que no final do exame seja injetado um contraste na sua veia para que possamos avaliar melhor o seu cérebro.

Você também fará outro exame chamado PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons). Esse exame será separado em duas etapas, podendo ser as duas partes feitas no mesmo dia ou dentro de uma semana (isso dependerá de sua disponibilidade e vaga no aparelho). Esse exame é realizado no mesmo equipamento que a ressonância magnética e para sua realização injetaremos uma medicação na sua veia e pequenas amostras de sangue serão coletadas de sua artéria durante o exame (um acesso será colocado para que não sejam necessárias várias picadas). É preciso sua colaboração para não mexer a cabeça e costas durante o exame. Apesar de a medicação ser radioativa, ela é segura e não causa malefícios para sua saúde. A quantidade de radiação que você receberá é pequena (menor que a radiação de um exame de radiografia com contraste). A ocorrência de qualquer alergia ou reação é muito rara.

Além de realizar os exames de ressonância e PET que você leu acima, você também será avaliado clinicamente pela equipe. A avaliação inclui perguntas sobre o histórico da sua doença (esclerose múltipla), um questionário sobre as outras doenças que você possa ter (comorbidades), testes para avaliar

a memória e a velocidade de raciocínio (avaliação neuropsicológica) e um exame neurológico completo com a finalidade de estabelecer seu grau de incapacidade no dia-a-dia.

4. Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

Durante os exames de ressonância magnética e de PET, o desconforto é o do tempo em que é preciso ficar no aparelho (70 minutos em cada fase). Algumas pessoas podem se sentir incomodadas com o barulho forte que o aparelho faz. Geralmente, no entanto, as pessoas conseguem relaxar e completar o exame sem grandes dificuldades. Não há outros riscos esperados neste tipo de exame. Caso se sinta desconfortável, o exame será interrompido imediatamente e remarcado, se você assim desejar.

Para o exame PET, um desconforto adicional será de uma picada da injeção na veia e a picada para colocar o cateter na artéria; em cada fase do exame.

Durante estes exames, você deverá se esforçar para não mexer a cabeça. As imagens do cérebro e da medula espinhal não serão utilizadas para outro fim, senão o de estudar a presença de inflamação e mudanças em mielina.

Estes exames são muito comuns e os únicos desconfortos que podem ocorrer são dores no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimose.

5. Benefícios esperados para o participante da pesquisa

Esta pesquisa pode trazer conhecimentos importantes para a utilização da imagem PET como instrumento de monitoramento e análise de resposta terapêutica de cada tipo de esclerose múltipla.

A ressonância magnética será utilizada como padrão para informações anatômicas e o PET será utilizado para avaliar se as alterações identificadas pela ressonância magnética são devido a processo inflamatório ou alteração em quantidade de mielina.

Essas informações poderão contribuir para tornar os métodos de imagem ferramentas para avaliação de novos e/ou atuais tratamentos da esclerose múltipla.

6. Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa

A sua participação nesta pesquisa será restrita à realização dos exames de imagem descritos acima e da avaliação clínica realizada concomitante. Nenhum acompanhamento ou assistência adicional será realizada através desta pesquisa.

7. Garantias de plena liberdade ao participante de recusar-se a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

A participação no estudo é livre e você poderá sair a qualquer momento sem que isso interfira em sua assistência no Hospital. É dado a liberdade de recusa de realizar qualquer procedimento sem prejuízo no seu tratamento.

Informamos que você receberá uma cópia deste termo assinado por nós, pesquisadores, para ter consigo.

8. Explicitação das garantias de ressarcimento por despesas decorrentes da pesquisa e explicitação da garantia de indenização por eventuais danos decorrentes da pesquisa

Não há quaisquer despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

9. Compromisso do pesquisador sobre utilizar os dados e o material biológico coletado

Nenhum material biológico (amostras de sangue coletados durante a imagem) será armazenado após término dessa pesquisa.

As imagens bem como os dados clínicos coletados poderão ser incluídas em outros estudos, sem a necessidade de repetição do exame, desde que você autorize.

(.....) SIM. Eu autorizo o uso destas imagens para cada pesquisa futura e estou informado(a) que a Comissão de Análise de projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não das imagens geradas neste estudo.

(.....) NÃO. Eu não autorizo o uso destas imagens e quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com estes dados.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas.

O principal investigador é o Prof Dr Carlos Alberto Buchpiguel (médico nuclear) que pode ser encontrado no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP localizado na Rua Ovídio Pires campos 872 – HCFMUSP, Telefone: 2661-8053 (endereço onde você realizará os exames).

A pesquisadora executante é a Dra Daniele de Paula Faria, que pode ser encontrada no mesmo endereço e telefone acima.

Você poderá contatar também a médica neurologista Milena Sales Pitombeira, que fará todo seu acompanhamento e sua avaliação clínica, pelo telefone: 97280-0108.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq) – Av. Dr. Ovídio Pires de campos, 225 – Prédio da Administração – 5º andar – telefone: (11) 2661-7585; (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “**IMAGEM PET EM PROCESSOS RELACIONADOS À DOENÇA ESCLEROSE MÚLTIPLA**”.

Eu discuti com o Dr Carlos Alberto Buchpiguel e/ou Dra Daniele de Paula Faria e/ou Dra Milena Sales Pitombeira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....BAIRRO:

CIDADECEP:..... TELEFONE: DDD

(.....)

2.RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

.....BAIRRO:

CIDADECEP:..... TELEFONE: DDD

(.....)

ANEXO 4 – Instrumento de avaliação clínica e funcional

DATA: ____/____/____

Número: _____

PROTOCOLO DE PESQUISA: ESCLEROSE MÚLTIPLA - HCFMUSP

FICHA: DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

ETIQUETA DO PACIENTE

Paciente: _____ Exame número: _____

Grupo: 1() 2() 3() 4()

Arteria: _____ PET PK: _____ PET PIB: _____

Aval. Neuropsi: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO E DEMOGRÁFICOS

INICIAIS	TELEFONES	DT. NASC.	COR	PROCEDÊNCIA/ MIGRAÇÃO	NATURALIDADE

DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS-CULTURAIS

ESCOLARIDADE	ESTADO CIVIL	PROFISSÃO	DESEMPREGADO	APOSENTADO	BENEFICIÁRIO

FORMA CLÍNICA E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE/PROGRESSÃO

Forma Clínica	Atividade	Última atividade clínica	Última atividade radiológica	Progressão
Data do 1º Sintoma	Data do Diagnóstico	Seguimento HC desde	Data última RM	Data última consulta

--	--	--	--

COMORBIDADES (Questionário) / ANTECEDENTES RELEVANTES:

OUTRAS MEDICAÇÕES EM USO

Finalidade	Medicação	Dose	Tempo de uso	Dia e hora da última dose
Depressão				
Fadiga				
Espasticidade				
Dor				
Alteração urinária				
Com 1:				
Com 2:				
Com 3:				
Vitamina D				
Outros				

EXAME NEUROLÓGICO DATA: ___ / ___ / ___

	Alterado	Se sim, descrever:
Cognitivo		
Motor		
Sensibilidade		
Coordenação		
Nervos cranianos		
Marcha		

HISTÓRICO DE EDSS EDSS DESTA AVALIAÇÃO: _____ DATA: ___ / ___ / ___

Mês/ano	EDSS	Sistemas funcionais acometidos

MSFC MSFC DESTA AVALIAÇÃO: _____ DATA: ___ / ___ / ___

Teste	Pontuação
<i>9-pin-hole (9-HTP)</i>	
<i>25-foot-walk (25-FW)- abaixo</i>	
<i>Paced Auditory Serial Addition test (PASAT)</i>	

1. **Timed 25-Foot Walk** Funções Motoras dos Membros Inferiores: Caminhada Cronometrada de 25 pés (7.62 metros)

Utiliza alguma órtese? Sim Não

Dispositivo de apoio foi usado? Sim Não

Dispositivo usado (marcar uma): Bilateral Muleta Unilateral Muleta

Trial 1: Cronometragem: _____ segundos

Registrar quaisquer circunstâncias que afetaram o desempenho dos pacientes.

Se a triagem não for completa: * Especificar: Incapaz de completar a triagem devido a limitações físicas. Outros _____

Trial 2 : Cronometragem: _____ segundos

Registrar quaisquer circunstâncias que afetaram o desempenho dos pacientes.

Se a triagem não for completa: * Especificar: Incapaz de completar a triagem devido a limitações físicas. Outros _____

Demorou mais de duas tentativas para realizar o teste completo? Em caso afirmativo, especificar _____ os _____ motivos.

Symbol Digit Modalities Test														
9	3	4	9	1	2	4	6	9	2	4	9	2	9	4
6	2	9	4	3	2	1	6	9	4	2	8	6	1	7
6	3	5	7	9	1	5	6	7	3	4	8	1	6	5
4	6	3	9	2	6	9	3	2	5	8	7	1	2	6
8	3	7	1	2	5	6	3	4	1	5	8	4	7	9
2	8	5	4	1	2	6	8	9	5	4	3	2	7	6
4	7	5	8	1	5	7	3	9	8	4	9	6	1	2
3	4	9	2	6	4	9	2	8	5	1	3	6	7	8

9-Hole peg test

Mão Dominante ____

T1

T2

Mão Não-dominante __

T1

T2

Paced Auditory Serial Addition Test (PASAT)									
9+1	3	5	2	6	4	9	7	1	4
10	4	8	7	8	10	13	16	8	5
1+4	8	1	5	1	3	7	2	6	9
5	12	9	6	6	4	10	9	8	15
4	7	3	5	3	6	8	2	5	1
13	11	10	8	8	9	14	10	7	6
5	4	6	3	8	1	7	4	9	3
6	9	10	9	11	9	8	11	13	12
7	2	6	9	5	2	4	8	3	1
10	9	8	15	14	7	6	12	11	4
8	5	7	1	8	2	4	9	7	9
9	13	12	8	9	10	6	13	16	16
3	1	5	7	4	8	1	3	8	2
12	4	6	12	11	12	9	4	11	10

Word List Generation

FRUTOS E VEGETAIS **90"**