



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE D
COIMBRA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA – TRABALHO FINAL

MARIA FRANCISCA DE AZEVEDO NUNES E MAURÍCIO GONÇALVES

***Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas no
tratamento da esclerose múltipla: o começo de uma nova era?***

ARTIGO DE REVISÃO NARRATIVA

ÁREA CIENTÍFICA DE NEUROLOGIA

Trabalho realizado sob a orientação de:
PROFESSORA DOUTORA MARIA ISABEL JACINTO SANTANA
DOUTORA INÊS MARTINS MALVA CORREIA

FEVEREIRO/2022

TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS NO TRATAMENTO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA: O COMEÇO DE UMA NOVA ERA?

Maria Francisca de Azevedo Nunes e Maurício Gonçalves¹; Maria Isabel Jacinto Santana, MD, PhD^{1,2}; Inês Martins Malva Correia, MD^{1,2}

¹ Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal.

² Serviço de Neurologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

Autora: Maria Francisca de Azevedo Nunes e Maurício Gonçalves

Endereço de correio eletrónico: frankikas@gmail.com

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra - Polo III, Ciências da Saúde Azinhaga
de Santa Comba, Celas
3000-548 Coimbra

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMO	6
ABSTRACT	7
INTRODUÇÃO	8
MATERIAIS E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
a) Procedimento e protocolos atuais	11
b) Mecanismo de ação	15
i. Um novo e diversificado repertório de células T	17
ii. Restauração da rede regulatória de células T	18
iii. Resposta reduzida de IL-17 pró-inflamatória	19
iv. Normalização da expressão de microRNA.....	20
v. Normalização de perfis de expressão génica	22
c) Estudos desenvolvidos	24
i. Impacto na atrofia cerebral.....	30
ii. Impacto em biomarcadores séricos e do líquido cefalorraquidiano	31
iii. Impacto na cognição, fadiga e qualidade de vida	32
d) Avaliação da segurança - mortalidade e morbilidade	34
e) Recomendações atuais - seleção de doentes	39
f) Recomendações atuais - seleção do protocolo	41
g) Perspetivas futuras	43
CONCLUSÃO	44
AGRADECIMENTOS	45
REFERÊNCIAS	46

ABREVIATURAS

AHSCT: Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas

ATG: Soro anti-timocitário

BEAM: Carmustina, etoposídeo, ara-citarabina e melfalano

BOC: Bandas oligoclonais

Bu: Bussulfano

Células NK: células *natural killer*

CMV: Citomegalovírus

CTLA-4: Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

CyC: Ciclofosfamida

DEG: Genes diferencialmente expressos

DMT: Terapêutica modificadora de doença

EA: Eventos adversos

EAE: Encefalomielite alérgica experimental

EBM: Sociedade Europeia de Transplante de Medula e Sangue

EBV: Vírus epstein-barr

EDSS: *Expanded disability status scale*

EM: Esclerose múltipla

EMPP: Esclerose múltipla primária progressiva

EMSP: Esclerose múltipla secundária progressiva

EMSR: Esclerose múltipla surto-remissão

Gd: Gadolínio

GITR: Proteína relacionada com o recetor do TNF induzida por glicocorticóides

HSCs: Células-tronco hematopoiéticas

HSV1: Vírus herpes simples tipo 1

IgG: Imunoglobulina G

LCR: Líquido cefalorraquidiano

MAIT: Células T invariante associada à mucosa

NEDA: Sem evidência de atividade de doença

NfL: Neurofilamentos

RCT: *Randomized controlled trials*

RM: Ressonância magnética

SNC: Sistema Nervoso Central

TCR: Recetor de células T

TGF-b: Fator de crescimento transformador-b-1

Treg: Células T reguladoras

TRM: Mortalidade relacionada com o tratamento

VZV: Vírus varicela-zoster

RESUMO

O transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (AHSCT) tem vindo a ganhar destaque nos últimos 20 anos no âmbito das doenças autoimunes, em particular da esclerose múltipla.

Este procedimento permite a erradicação do sistema imunológico autorreativo e a sua posterior reconstituição a partir de células-tronco hematopoiéticas, constituindo um processo de “reiniciação imunológica”, através da diversificação do repertório de células T e da restauração da sua rede regulatória, redução da resposta da interleucina-17 e normalização da expressão de microRNAs e perfis de expressão génica.

Evidências crescentes sugerem que o AHSCT pode suprimir totalmente a atividade da doença em 70%-92% dos casos, aos 2 anos, uma taxa superior à das atuais terapêuticas aprovadas. A sua eficácia foi também demonstrada a nível da atrofia cerebral, biomarcadores séricos e do líquido cefalorraquidiano, cognição, fadiga e qualidade de vida.

Com o aumento da experiência e desenvolvimento dos protocolos, os riscos do procedimento têm vindo a diminuir para níveis considerados aceitáveis. Os eventos adversos mais comuns são precoces e correspondem a toxicidades orgânicas, citopenias e infeções, porém, a longo prazo, está descrita a possibilidade de autoimunidade secundária e malignidade. Nos estudos mais recentes, a mortalidade relacionada com o tratamento é estimada em 0,2%.

A eficácia máxima verifica-se em doentes mais jovens, com menor duração da doença, menos comorbilidades e evidência de doença muito ativa ou refratária ao tratamento. Assim, o AHSCT surge como uma nova alternativa de tratamento na EM, em centros especializados que assegurem adequada seleção do protocolo e correto acompanhamento do doente para otimizar a segurança do mesmo.

A presente revisão, baseada em estudos publicados entre 2016 e 2021, que incluíram 20 ou mais doentes, pretende esclarecer e sistematizar a informação existente sobre o AHSCT tanto no que diz respeito aos mecanismos de ação subjacentes, procedimentos e protocolos existentes, bem como benefícios e riscos associados.

Palavras-chave: Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas, Esclerose múltipla

ABSTRACT

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) has been gaining prominence over the last 20 years in the context of autoimmune diseases, particularly multiple sclerosis.

This procedure allows the eradication of the autoreactive immune system and its subsequent reconstitution from hematopoietic stem cells, constituting a process of "immune reinitiation" by diversifying the T-cell repertoire and restoring its regulatory network, reducing the interleukin-17 response and normalizing the expression of microRNAs and gene expression profiles.

Increasing evidence suggests that AHSCT can fully suppress disease activity in 70%-92% of cases at 2 years, a higher rate than current approved therapies. Its efficacy has also been demonstrated in brain atrophy, serum and cerebrospinal fluid biomarkers, cognition, fatigue and quality of life.

With increasing experience and protocol development, the risks of the procedure have been decreasing to levels that are considered acceptable. Early adverse events such as organ toxicities, cytopenias, and infections, are the most common but in the long term, the possibility of secondary autoimmunity and malignancy have been described. In the most recent studies, treatment-related mortality is estimated at 0.2%.

Maximum efficacy is seen in younger patients with shorter disease duration, fewer comorbidities and evidence of very active or treatment-refractory disease. Thus, AHSCT emerges as a new treatment alternative in MS, in specialized centers that ensure adequate protocol selection and correct patient follow-up to optimize its safety.

This review, based on studies published between 2016 and 2021, which included 20 or more patients, aims to clarify and systematize the existing information on AHSCT both in terms of the underlying mechanisms of action, existing procedures and protocols, as well as associated benefits and risks.

Key-words: Autologous hematopoietic stem-cell transplantation, Multiple sclerosis

INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a doença inflamatória crônica mais comum do sistema nervoso central e principal causa de incapacidade por etiologia não traumática em adultos jovens, estimando-se que atualmente atinja cerca de 2.8 milhões de pessoas a nível mundial, com uma prevalência global de 35,9/100.000. Desta forma, está associada a elevados custos socioeconômicos, não só derivados da incapacidade do doente, mas também das despesas de saúde associadas ao tratamento e acompanhamento do mesmo. (1,2)

Patologicamente, as características cardinais da EM são a inflamação perivascular, a desmielinização e a degenerescência axonal. (3)

A supressão da atividade inflamatória é atualmente a base do tratamento da EM e a introdução da terapêutica modificadora da doença (*disease modifying treatment* - DMT) demonstrou que a modulação imunológica pode reduzir a taxa de surtos clínicos e as alterações em ressonância magnética (RM) associadas à inflamação, levando, por sua vez, a uma redução de incapacidade acumulada. (4)

Atualmente, múltiplos fármacos estão disponíveis para o tratamento da EM, porém nenhum demonstrou prevenir ou reverter totalmente a deterioração neurológica progressiva. (5) Por outro lado, com os tratamentos atualmente aprovados para a EM, calcula-se que menos de 10% dos doentes se mantêm numa situação que se pode considerar de “sem evidência de doença” (*no evidence of disease activity* - NEDA) após 7 anos de DMTs. (6)

Assim, mais recentemente, o uso de terapêuticas de reconstituição imune pulsada têm vindo a ganhar destaque no panorama terapêutico da EM. (3) No extremo desta abordagem encontra-se o transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (*autologous hematopoietic stem cell transplant* – AHSCT) cujo fundamento imunológico é a erradicação de um sistema imunológico autorreativo por meio de uma imunossupressão máxima, seguida de reconstituição imunológica, usando células-tronco hematopoéticas (*hematopoietic stem cell* - HSCs) dos próprios doentes, permitindo restaurar, assim, a homeostasia normal e a tolerância imunológica. (7)

O AHSCT foi originalmente desenvolvido para o tratamento de neoplasias hematológicas, mas ganhou destaque no final da década de 90, quando começaram a ser desenvolvidos estudos

sobre a sua utilidade em doenças autoimunes agressivas e refratárias, como a esclerose múltipla, esclerose sistémica, artrite reumatóide e lúpus eritematoso sistémico. (8–12)

No âmbito da EM, surgiu no seguimento de estudos pré-clínicos usando modelos animais de encefalomielite alérgica experimental (EAE) publicados na década de 90. Nestes estudos, a terapia mieloablativa com bussulfano e ciclofosfamida (CyC) ou com irradiação corporal total, seguido de um transplante de células-tronco alogénicas ou singénicas, resultou na recuperação de défices neurológicos prévios, redução de surtos clínicos e foi capaz de induzir uma remissão duradoura no modelo experimental. (13,14)

O estudo pioneiro da utilização de AHSCT em doentes com EM foi publicado em 1997, (11) consistindo numa coorte de 15 doentes com doença progressiva submetidos a AHSCT em 1995. Nesse seguimento, durante as duas últimas décadas, desenvolveu-se uma pesquisa considerável sobre a utilização de AHSCT no tratamento da EM, tendo já sido publicados mais de 25 ensaios clínicos. (5,11,15–25)

A inclusão deste tratamento na panorâmica terapêutica atual tem sido alvo de discussão, sendo consensual que a sua utilização deverá ser reservada para casos selecionados, em centros capazes de prestar o acompanhamento adequado. (7)

Este artigo de revisão narrativa tem como objetivo sistematizar e fornecer uma descrição clara da informação que existe na literatura acerca do AHSCT em doentes com EM, no que diz respeito ao procedimento, protocolos e mecanismos de ação. Em seguida, é apresentada uma análise crítica atualizada das evidências publicadas sobre a eficácia e os riscos associados ao AHSCT. Por fim, é feita referência às atuais recomendações sobre a seleção do candidato ideal e do protocolo mais indicado e eventuais perspetivas de futuro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a elaboração deste artigo de revisão narrativa, foi realizada uma pesquisa bibliográfica na base de dados PubMed utilizando como termos “multiple sclerosis”, “stem cell”, “autologous transplant” NOT “mesenchymal”.

A pesquisa incluiu artigos escritos apenas em inglês e, no processo de seleção, foram analisados os títulos, *abstracts* e texto integral quando conveniente. Adicionalmente, para contextualização do tema, foram incluídos artigos referenciados nas publicações inicialmente selecionadas pela sua relevância no tema, nomeadamente artigos de referência na esclerose múltipla e nesta forma de tratamento.

Foram também selecionados estudos clínicos ou observacionais de 2016 a 2021, excluindo-se estudos com menos de 20 doentes. Para tal, foram considerados os critérios de inclusão de cada estudo, o protocolo de tratamento e a eficácia avaliada pela ausência de evidência de atividade da doença (*No evidence of disease - NEDA*), *Expanded disability status scale* (EDSS), evolução imagiológica, início DMT após o transplante, resultados funcionais, atrofia cerebral e medidas laboratoriais. Foram ainda avaliados os resultados de segurança e a mortalidade associada ao transplante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

a) Procedimento e protocolos atuais

A realização de AHSCT em contexto de EM é um procedimento complexo que depende da contribuição de uma equipa multidisciplinar em centros qualificados, sendo apenas realizados em unidades de transplantes credenciadas pela *Joint Accreditation Committee of EBMT and ISCT* (JACIE) ou organizações equivalentes. (26)

Apesar de existirem variações nos protocolos de AHSCT entre as unidades de transplante e atualmente não haver consenso sobre o regime de tratamento ideal para EM, o procedimento é comum e envolve várias etapas: (I) mobilização de HSCs, (II) colheita e preservação de HSCs, (III) condicionamento imunoablativo, (IV) infusão de HSCs ou “transplante” e (V) cuidados pós-transplante. (27,28)

Antes da mobilização, as terapêuticas imunomoduladoras devem ser descontinuadas para minimizar os riscos do procedimento e permitir uma mobilização bem-sucedida. Apesar de não haver ainda consenso para a duração dos períodos de *wash-out*, preconiza-se que seja de pelo menos 6 semanas para o fumarato de dimetilo, fingolimod e natalizumab, e 6 meses para alemtuzumab, ocrelizumab e cladribina. No caso de interferões ou acetato de glatirâmero não é necessário *wash-out*. Para reduzir o risco de surtos durante o período de *wash-out*, podem ser associados pulsos de corticoesteróides. (7) No caso de doentes previamente sob natalizumab que sejam positivos para o vírus JC, recomenda-se a realização de punção lombar com pesquisa do vírus no líquido cefalorraquidiano (LCR) para exclusão de infeção do SNC e assim evitar o desenvolvimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva após o AHSCT. (29)

Para o processo de mobilização das HSCs atualmente é administrado um agente que promove a libertação de células tronco da medula para a corrente sanguínea, como o filgrastim, que é um fator estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF: 5–10 µg/kg/dia). A sua utilização pode provocar uma recidiva inflamatória e, por isso, recomenda-se que sejam co-administrados doses elevadas de esteróides ou ciclofosfamida (2-4 g/m²). (7)

Posteriormente, as células-tronco são recolhidas do sangue periférico, na maioria das vezes por leucoafereze, com um valor ideal de $4-5 \times 10^6/\text{kg}$ de peso corporal e um limite mínimo de segurança de $2 \times 10^6/\text{kg}$. (7) Nestes excertos, habitualmente apenas 3 a 5% das células são HSCs, e as restantes células incluem granulócitos, monócitos e linfócitos. Por isso, em alguns protocolos, o excerto de células tronco é manipulado *ex vivo* de forma a selecionar apenas células-tronco hematopoiéticas que expressam CD34, numa tentativa de eliminar potenciais linfócitos autorreativos. Porém, esta técnica é bastante dispendiosa e não demonstrou melhorar de forma significativa os resultados. (28) Essas células são de seguida criopreservadas. (7,30)

A mobilização e colheita das HSCs podem ser realizadas em ambulatório, num intervalo de tempo de 5 a 15 dias. (1,27)

A admissão na unidade hematológica para o condicionamento ocorre em média 2-4 semanas após a colheita das HSCs (1), e envolve a administração de fármacos citotóxicos, com o objetivo de conduzir à ablação do sistema imunológico autorreativo. (27)

Relativamente ao condicionamento, os primeiros ensaios clínicos foram elaborados com base em estudos em animais (28), sugerindo a necessidade de imunoablação de alta intensidade com regimes mieloablativos usando irradiação corporal total e/ou quimioterapias capazes de penetrar a barreira hematoencefálica. Porém, verificou-se que a quimioterapia de alta intensidade está associada a um aumento de eventos adversos e complicações, incluindo infeções, malignidade secundária, progressão da incapacidade e mortalidade relacionada com o tratamento (*Treatment Related Mortality – TRM*), possivelmente devido a neurotoxicidade. (31) Desta forma, o uso de regimes de intensidade intermédia/baixa quando associados a uma adequada seleção de doentes, tem vindo a ganhar importância, estando aparentemente associados a uma menor taxa de TRM. (32)

Atualmente, de acordo com as diretrizes da Sociedade Europeia de Transplante de Medula e Sangue (EBMT), os regimes de condicionamento são classificados em três graus de intensidade, conforme ilustrado na Tabela 1: (7)

- Os regimes menos intensos incluem apenas quimioterapia, como por exemplo CyC isoladamente, sendo por isso não-mieloablativo. No entanto, os resultados a longo prazo são bastante limitados. (7)

- Os regimes intermédios, são os mais recomendados e, como tal, mais usados pela maioria dos centros de transplante. (7) Estão subdivididos em: mieloablativos, que incluem carmustina (biscloretilnitrosourea - BCNU - B), etoposídeo (E), ara-citarabina (A) e melfalano (M), associado a soro anti-timocitário (ATG) – BEAM-ATG (1) e não-mieloablativos, que incluem CyC associada a ATG – CyC-ATG. (16)
- Os regimes mais intensivos utilizam bussulfano (Bu), um agente antineoplásico alquilante não específico do ciclo celular, e CyC de alta dose, que penetra a barreira hematoencefálica para exercer seu efeito no SNC, eventualmente combinado com ATG (Bu-CyC-ATG). A irradiação corporal total é também um procedimento de alta intensidade, mas que atualmente já não é usado neste tratamento. (7,33,34) Estes regimes de alta intensidade estão associados a maiores toxicidades e valores mais altos TRM. (32)

No que diz respeito à depleção de células T, nos estudos efetuados a maioria dos doentes com EM foi tratada com ATG de coelho (rATG). O uso de ATG de cavalo (hATG) teve eficácia inferior num estudo inicial executado entre 2001–2006. (35)

A escolha do tipo e dose de rATG depende da disponibilidade e preferência do centro, mas na literatura publicada tem sido mais utilizado rATG policlonal do tipo timoglobulina, administrado na dose de 5–7,5 mg/kg. (7)

Tabela 1. Protocolos de condicionamento usados no AHSCT, na esclerose múltipla. Adaptado de Sharrack B et al (2020). (7)

INTENSIDADE	REGIMES DE CONDICIONAMENTO
Baixa	Regimes de quimioterapia isolada (CyC ; Melfano; etc)
Intermédia (linfoablative / não-mieloablative)	Ciclofosfamida + ATG (CyC-ATG)
Intermédia (mieloablative)	BCNU + Etoposídeo + Ara-citarabina + Melfano + ATG (BEAM-ATG)
Alta	Irradiação corporal total (TBI), Ciclofosfamida e ATG Bussulfano, Ciclofosfamida e ATG (Bu-CyC-ATG)

CyC, ciclofosfamida; BCNU, carmustina; BEAM, BCNU, etoposídeo, ara-citarabina, melfano; ATG, soro anti-timocitário; TBI, irradiação corporal total; Bu, bussulfano

Após o condicionamento, o enxerto previamente selecionado e purificado, é descongelado e transfundido por via intravenosa. (7)

Todo o procedimento requer cuidados de suporte e monitorização, a fim de reduzir os eventos adversos (EA). As medidas de cuidado de suporte incluem agentes antimicrobianos profiláticos, antieméticos, antidiarreicos, transfusão de hemoderivados, suplementação nutricional, analgesia e estimulação da hematopoiese por citocinas. (36)

A monitorização nos primeiros 3-6 meses pós-alta é essencialmente focada na prevenção de infeção, com recurso a determinadas profilaxias. Geralmente, a profilaxia oral deve cobrir infeções fúngicas (com um azol) durante 3 meses, o vírus do herpes (com aciclovir) por um período de 6-12 meses e, ainda, a infeção por pneumocistis também por um período de 6-12 meses. (7)

A reativação viral é significativa, portanto, a monitorização de carga viral de vírus epstein-barr (EBV) e citomegalovírus (CMV) por *polimerase chain reaction* (PCR) é obrigatória durante os primeiros 100 dias. A reativação de EBV geralmente resolve-se espontaneamente, mas pode precisar de tratamento com rituximab e pode estar associada a eventos neurológicos e

paraproteinemia de novo. (37) Também é recomendada a monitorização imunológica de subconjuntos de células T e B e de níveis de imunoglobulina, de 3 em 3 meses no primeiro ano e, em seguida, anualmente, de forma a detetar paraproteinemia e orientar a profilaxia da infeção. (38)

O programa de vacinação de rotina pós-transplante proposto nas diretrizes das *Infectious Diseases Society of America (IDSA)* e *European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL)* consiste em: vacina pneumocócica conjugada aos 3, 4 e 5 meses, seguida pela vacina contra o *haemophilus influenzae* tipo B (HIB conjugada), vacina contra a difteria/tétano/tosse convulsa (DTP) e vacina inativada da poliomielite aos 6, 7 e 8 meses e, por fim, vacina polissacarídica pneumocócica aos 12 meses. Doentes que não estão sob terapêutica imunossupressora devem realizar serologias para o sarampo e varicela 24 meses após o transplante e, se negativos, devem ser imunizados com duas doses de vacina combinada contra o sarampo/parotidite/rubéola (VASPR) e vacina contra a varicela, com pelo menos 4 semanas de intervalo. Os doentes também devem receber vacina anual contra a gripe. (7) Não existem ainda dados relativos à vacina contra o COVID-19.

b) Mecanismo de ação

Preconiza-se que o AHSCT exerça seu efeito terapêutico através de “reiniciação imunológica”. Vários mecanismos contribuem para este fenómeno, nomeadamente a renovação do repertório de células T, o aumento da sua diversidade e a reativação tímica com produção de linfócitos T. (39,40) Também podem ser observadas alterações na proporção relativa dos subconjuntos de células T e B, com aumento das populações reguladoras e redução das populações pró-inflamatórias (41,42), bem como mudanças na expressão genética com *downregulation* de microRNAs associados à doença, conforme exemplificado na Figura 1. (43,44)

Imediatamente após AHSCT, ocorre depleção das células imunes adaptativas (linfócitos T e B) e inatas (células dendríticas, *natural killer*, monócitos e granulócitos), incluindo as populações de linfócitos patogénicos, e o “novo sistema imunológico” desenvolve-se a partir das HSCs. (1,45)

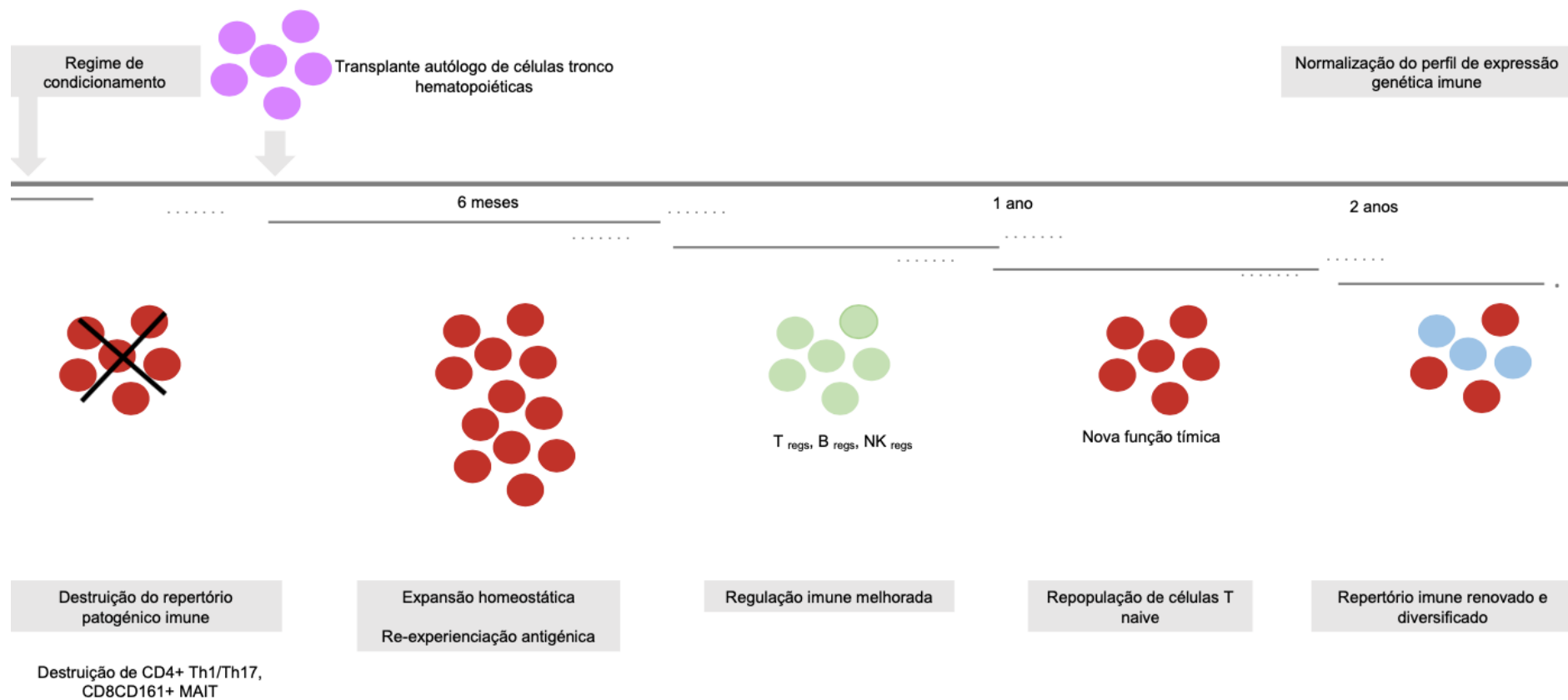


Figura 1. Modelo proposto de mecanismos terapêuticos do transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (AHSCT). O regime de condicionamento leva à erradicação das células imunes patogénicas. Durante os 6 meses após o AHSCT, a expansão do repertório de células T produz CD8+ e, em menor número, células T CD4+. Subsequentemente, 1-2 anos após o transplante, a renovação imunitária através da timopoiese leva a um aumento do número de células CD4+ e CD8+ naïve, com diversificação do repertório de células T. Em paralelo, a reconstituição das células B naïve restaura o repertório de células B e aumenta a diversidade de anticórpors. Foi demonstrada alguma normalização dos perfis de expressão genética, que favorecem a restauração da tolerância imunológica após a conclusão da reconstituição imune, 2 anos após o AHSCT. MAIT, célula T invariante associada à mucosa; NK, *natural killer*. Adaptado de Muraro PA *et al* (2017). (1)

i. Um novo e diversificado repertório de células T

Durante as primeiras semanas, ocorre um aumento das células *natural killer* (NK), células T CD8+, células B e monócitos. (45) Aos 6 meses, essas células, já terão retornado ao seu número basal. Por outro lado, o aumento das células T CD4+ ocorre apenas ao fim de 12 a 24 meses após o transplante. (45) Nesse sentido, a proliferação de linfócitos traduz-se numa inversão da razão CD4+/CD8+ até aos 24 meses. Isto acontece porque a re-população de células CD8+ e CD4+ ocorre através de mecanismos distintos: CD8+ por expansão periférica de células pré-existentes e CD4+ por regeneração tímica. (45)

Nos estudos efetuados, a maioria das células CD8+ presentes nos 2 meses após o transplante foram também detetadas no ambiente imune pré-transplante, sugerindo que estas células sobrevivem à imunoblação e proliferam rapidamente num ambiente linfopénico pós-transplante. Autores sugerem que a expansão periférica de clones CD8+ é impulsionada pela “paisagem viral circundante”, onde vírus como o EBV e o CMV ativam e expandem clones CD8+ específicos. Isso causa uma restrição inicial no repertório de recetores de células T (*T-cell receptor* – TCR) com domínio desses clones específicos para esses vírus. (46) Além disso, o AHST não demonstrou alterar as proporções relativas de tipos de células naïve e de memória central dentro do pool de células T CD8+. (39)

Por outro lado, o repertório de TCR diversifica-se com a introdução de novas células CD4+, que, ao contrário da reconstituição precoce do *pool* de CD8+, se deve a produção tímica tardia de células *naïve* (CD45RA+/CD45RO-/CD27+). De facto, através de marcadores fenotípicos de subtipos específicos de células T, foi demonstrado que a frequência de células CD4+ *naïve* duplica em 2 anos, enquanto a frequência de células CD4+ de memória central (CD45RA-/CD45RO+/CD27+) diminui para metade. Isso significa que ¼ do pool de células T CD4+ que tinha sido ocupado por células T de memória central antes do transplante, é substituído por células T *naïve*. Este facto é de máxima relevância na medida em que as células T *naïve* estão associadas a uma maior tolerância imunológica, enquanto as células T de memória são mediadoras da autoimunidade. Esta mudança em frequência relativa é apontado como um dos mecanismo de tolerância imunológica pós-transplante. (39)

Além disso, a análise dos círculos de excisão do recetor de célula T (*T cell receptor excision circles* – TREC) mostrou que as células T CD4+ *naïve* recém-geradas eram originadas exclusivamente no timo. A nova composição do compartimento CD4+ foi confirmada num

estudo posterior de Muraro *et al.* (46), em que o sequenciamento da cadeia de TCR β revelou que 82% dos clones CD4+ presentes no ambiente pós-transplante não estavam presentes antes do transplante. A reativação do timo pós-transplante é então um achado importante, pois desempenha um papel crítico na tolerância imunológica, por meio diversificação do repertório de TCR. (47)

É importante mencionar que a remissão clínica e radiológica da doença também foi alcançada numa coorte de doentes em que se utilizou um condicionamento não-mieloablativo e nos quais não houve reconstituição do compartimento de células T bifásico. Em vez disso, tanto a população CD4+ como a CD8+ foram regeneradas através da expansão periférica de células pré-existentes, tendo sido a ação do timo insuficiente para aumentar a frequência de células CD4+ naïve. (42) Isto sugere que outros mecanismos para além da produção tímica de células CD4+ naïve, contribuem para a supressão da doença. (42)

ii. Restauração da rede regulatória de células T

Mesmo após AHSCT mieloablativo e em situação de remissão clínica e radiológica sustentada, nos estudos efetuados têm sido identificadas células T reativas à mielina, que ressurgem espontaneamente e se expandem *in vivo*. Neste enquadramento, tem sido investigado o mecanismo que impede as células T autorreativas persistentes de reiniciar a doença no ambiente pós-transplante. Têm sido apontadas como possíveis explicações as mudanças qualitativas no ambiente pós-transplante. De acordo com esta hipótese não será necessário atingir a eliminação completa das células autorreativas, sendo sobretudo importante converter o fenótipo pró-inflamatório para um fenótipo anti-inflamatório. (48–50)

É reconhecido que os doentes com EM têm uma produção tímica alterada com uma consequente redução na frequência de células T reguladoras (Treg) circulantes, expansão periférica de Treg de memória prejudicada e desvio de Treg existentes em direção a um fenótipo pró-inflamatório. (47,51) Assim, a reativação da produção tímica é importante na medida em que promove um aumento dos níveis de Treg circulantes (19,42,44,48,52,53), que são mediadores críticos da tolerância imunológica, através da regulação e supressão da atividade das células T. (47)

Os ensaios clínicos têm demonstrado consistentemente que tanto em regimes mieloablativos como não-mieloablativos é induzido um aumento significativo e transitório nos níveis de CD4+/CD25high/FoxP3+ Treg circulantes. (19,42,44,48,52,53)

Por outro lado, tem sido proposto que o AHSCT aumenta a capacidade imunossupressora funcional de Treg não só pelo aumento da sua frequência, mas também através da regulação positiva das moléculas imunorreguladoras de superfície dos Treg, como a proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4* – CTLA-4) e a proteína relacionada com o receptor do fator de necrose tumoral induzida por glicocorticóides (*glucocorticoid-induced TNFR-related protein* – GITR). (44)

Existe ainda um aumento transitório nas células NK reguladoras e uma modificação na rede de quimiocinas no ambiente pós-transplante, podendo afetar as interações entre as células imunes e o recrutamento de células inflamatórias para o SNC. (48)

Outro aspeto relevante diz respeito ao aumento dos níveis circulantes de células T CD8+/CD28-/CD57+ (39,42,53), um subtipo de célula T de memória efetora, que exerce um efeito imunossupressor nas células CD8+ e nas células NK, (54,55) sendo essa alteração mantida até aos 4 anos. (53) Uma população expandida dessas células poderia melhorar a rede regulatória, colaborando sinergicamente com Treg no ambiente pós-transplante. (53)

iii. Resposta reduzida de IL-17 pró-inflamatória

Nos estudos efetuados verificou-se que, apesar da reatividade aos autopeptídeos de mielina ressurgir no ambiente pós-transplante, o equilíbrio entre as respostas das células T pró e anti-inflamatórias parece evoluir para um padrão mais tolerante. (48–50)

Neste sentido, ensaios de citometria de fluxo revelaram que, após AHSCT mieloablativo, as células T CD8+ e CD4+ (Th17, Th1/Th17) periféricas implicadas na patogénese de EM (47) desenvolvem uma menor resposta/produção da interleucina-17 (IL-17) pró-inflamatória. Esta interleucina promove um ambiente inflamatório do SNC, aumentando a permeabilidade e recrutando linfócitos para o SNC (56) e, portanto, a sua diminuição contribui para um ambiente anti-inflamatório do SNC. Esta diminuição é corroborada por mudanças paralelas na expressão de RNA. (48)

Esse mesmo estudo demonstrou reduções nos níveis de citocinas, levando os autores a colocar a hipótese de que a alteração das interações entre células apresentadoras de antígenos e células T possam também contribuir para a formação de um fenótipo de células T mais anti-inflamatório. (48)

Da mesma forma, outro estudo demonstrou que o AHST mieloablativo suprimiu completamente a resposta pró-inflamatória de IL-17 produzida pelas células Th17 ativadas pela glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (*myelin oligodendrocyte glycoprotein* - MOG). (52) Também se verificou uma supressão da resposta pró-inflamatória da IL-17 a MOG, através da secreção aumentada do fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1) por Treg. (52)

Além disso, verificou-se que o AHST não-mieloablativo reduz, a níveis quase indetectáveis, um subtipo de células T CD8⁺ produtoras de IL-17, denominadas células T invariante associada à mucosa (*mucosal-associated invariant T cells* – MAIT). (42) Embora se originem no intestino, expressam CCR6, um recetor de *homing* do SNC, que facilita a transmigração através da barreira hematoencefálica. (57) Estas células pró-inflamatórias produzem interferão gama, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e IL-17. (42) As células MAIT são encontradas no infiltrado de células imunológicas das lesões de EM em autópsia e os níveis circulantes estão aumentados no sangue periférico de doentes com EM, em comparação com os controlos, tendo sido consistentemente implicadas na patogénese da EM. (42,58) Portanto, é de interesse significativo que o AHST possa induzir a supressão sustentada deste tipo de células. (42)

iv. Normalização da expressão de microRNA

Alguns autores propõem que mudanças epigenéticas podem estar subjacentes a muitas das modificações imunológicas que ocorrem no ambiente pós-transplante. (44)

De facto, os microRNAs (miRNAs) contribuem para a regulação imunológica através da modulação pós-transcricional de genes que codificam proteínas (59) e estão alterados em doentes com EM, tendo sido descrita a regulação positiva de três miRNAs: miR-155 (60,61), miR-142-3p (62) e miR-16 (63).

O AHSCT resulta na regulação negativa destes três miRNAs e num aumento correspondente da expressão dos seus genes alvo, normalmente silenciados: FOXP3, FOXP1 e IRF2BP2.(44) Esses genes estão implicados na formação de Treg e na manutenção da ação de citocinas anti-inflamatórias. (64–66) A reativação desses genes poderá assim ser a base da restauração da rede de células T regulatórias. (19,42,44,48,52,53)

Outro gene alvo do miR-16, diz respeito ao *Programmed Cell Death Protein 1* (PDCD1). Este assume particular interesse ao codificar a produção de uma proteína da superfície celular - a proteína de morte celular programada 1 (PD-1). PD-1 é um recetor inibitório expresso em células T, células B, células NK, células dendríticas e monócitos (53) e desempenha um papel crítico na manutenção da tolerância imunológica por meio da regulação da proliferação e reatividade das células T. A interação de PD-1 com a molécula co-estimuladora, PD-L1, resulta num aumento da secreção da citocina anti-inflamatória, IL-10, e supressão da proliferação de células T. (67,68) PD-1 também está implicado na polarização de Treg periféricos (69) e na mediação da apoptose de células T autorreativas. (68,70)

Os estudos efetuados têm demonstrado de forma convincente o papel protetor de PD-1 no desenvolvimento e progressão da EM. Estudos em animais mostraram que o bloqueio ou deleção genética de PD-1 resulta numa maior rapidez do desenvolvimento e gravidade da EAE. (71–73) Estudos clínicos demonstraram que a expressão de PD-1 está estreitamente relacionada com padrões de atividade da doença de EM (68) e ainda que o polimorfismo PD-1 está associado à progressão da EM. (74)

A apoiar este mecanismo, Arruda *et al.* (44) demonstraram que uma regulação negativa do miR-16 após AHSCT está associada a um aumento correspondente na expressão de PDCD1 e um aumento transitório na expressão do recetor de PD-1 na superfície de ambas as células B e T. A regulação positiva transitória de PD-1, conduzindo à expansão transitória do pool Treg, poderia ser suficiente para induzir uma tolerância imunológica de longa duração, através da promoção de um ambiente anti-inflamatório no qual as células T emergentes são deslocadas para um fenótipo mais auto-tolerante e anti-inflamatório. (19,42,44,48,52,53) Um estudo posterior do mesmo grupo apontou a regulação positiva precoce de PD-1 em células B e T como a única correlação imunológica do resultado neurológico a longo prazo do AHSCT não-mieloablativo. (53) Assim, uma estratégia de intervenção seletiva na PD-1, sem a necessidade de AHSCT, apresenta-se como um novo alvo terapêutico no futuro. (75)

v. Normalização de perfis de expressão génica

A importância do ambiente na modulação da expressão génica está bem estabelecida, sendo provável que as alterações epigenéticas induzidas pelo estado linfopénico pós-transplante justifiquem muitas das modificações imunológicas pós-transplante. Desta forma, a reconstituição imune, através da reprogramação da expressão transcripcional dentro de células CD4+ e CD8+ periféricas, pode contribuir para a formação de um ambiente imune mais tolerante. (1)

Sousa *et al.* investigaram, com a tecnologia de *microarray* DNA-chip, os perfis de expressão génica de células periféricas CD8 + e CD4+ de 16 doentes com EM, antes e após AHSCT não mieloablativa, comparando-os a controlos saudáveis. (43) Antes do AHSCT, os perfis de expressão de doentes com EM eram distintos dos controlos com mais de 2.000 genes diferencialmente expressos (DEG) tanto em células CD4+ e CD8+.

De facto, muitos destes DEG estão implicados na regulação da tolerância imunológica e respostas inflamatórias, o que apoia uma forte contribuição genética para a natureza disfuncional das células T. Por este motivo, é reconhecido que os DEG são patogénicos e a sua subsequente regulação negativa pode levar à remissão clínica. Neste estudo, após o transplante observaram-se alterações transcripcionais extensas nos perfis de expressão de células CD4+ e CD8+, de modo que, a maioria dos DEG foram regulados negativamente, 70% e 77% respetivamente. Além disso, 2 anos após o transplante, as células T CD8+ revelaram mudanças mais extensas na expressão destes genes envolvidos em respostas imunes efetoras, apresentando perfis semelhantes aos controlos. Porém, nas células CD4+, os perfis de expressão permaneceram distintos dos controlos saudáveis. Uma análise mais detalhada revelou que estes genes regulam tanto a ativação e migração como a função efetora das células T. A sua modulação pode, portanto, contribuir para a mudança observada em direção a um fenótipo de células T anti-inflamatórias após o AHSCT. (19,42,44,48,52,53)

Em suma, uma série de estudos pós-transplante mostraram que o repertório de células T, particularmente de células T CD4+, pode ser quase completamente renovado e a sua diversidade aumentada. (39) Outros estudos concluíram que a resposta de células T pró-inflamatórias efetoras estão diminuídas após o transplante, incluindo a expressão de mRNA, a frequência de células Th17 e a produção de IL-17A. (48) Há ainda uma depleção de MAIT, uma diminuição de microRNAs inflamatórios associados à EM (miR-142-3p, miR-155 e miR-

16), com consequente aumento das células reguladoras T e NK, e um aumento da expressão de recetores de *checkpoint* imunológicos e moléculas reguladoras, como CTLA-4, GITR, PD-1 e TGF-b1, tal como demonstrado na Figura 2. (1,76)

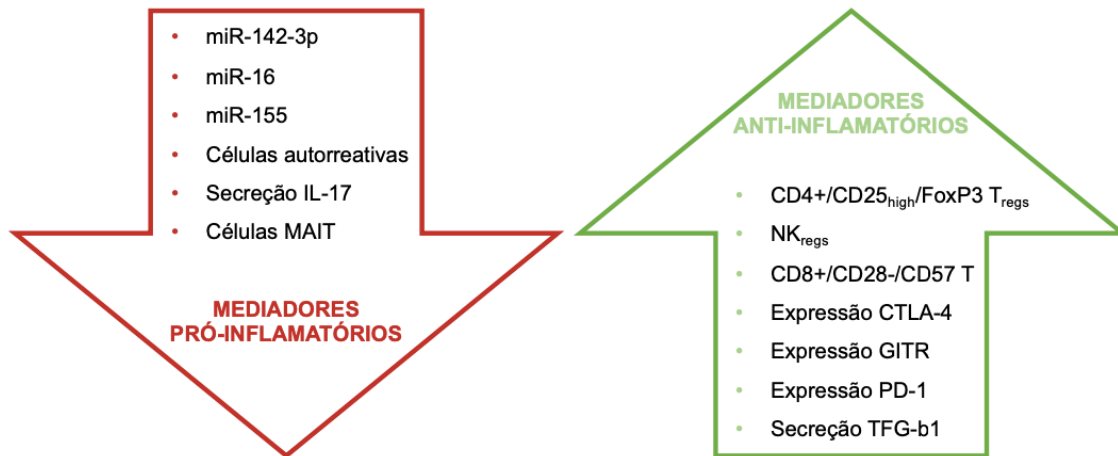


Figura 2. Mecanismo de ação proposto para explicar o efeito terapêutico do transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas (AHSCT) na Esclerose Múltipla. Após o AHSCT verifica-se uma diminuição da resposta de células T pró-inflamatórias efetoras, incluindo a produção de IL-17, uma depleção de células MAIT e diminuição de microRNAs inflamatórios (miR-142-3p, miR-155 e miR-16), com consequente aumento das células reguladoras T e NK, e aumento da expressão de recetores de *checkpoint* imunológicos e moléculas reguladoras, como CTLA-4, GITR, PD-1 e TGF-b1. Outro aspeto relevante diz respeito ao aumento dos níveis circulantes de células T CD8+/CD28-/CD57+. miR, microRNAs; IL-17, interleucina-17; MAIT, célula T invariante associada à mucosa; NK, *natural killer*; CTLA-4, proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico; GITR, proteína relacionada com o recetor do fator de necrose tumoral induzida por glicocorticóides; PD-1, proteína de morte celular programada 1; TGF-b1, fator de crescimento transformador-b-1. (1,39,46,48)

c) Estudos desenvolvidos

A maioria dos estudos publicados de AHSCT na EM consistiram em ensaios clínicos de fase II/III ou, então, em coortes observacionais, nos quais a eficácia foi avaliada pela comparação da atividade da doença antes e após o transplante. (15–17,24,25,77–79)

Em 2015 foi publicado por Mancardi e colegas o primeiro ensaio multicêntrico de fase II (ASTIMS), no qual foram randomizados 21 doentes: 12 receberam mitoxantrona e 9 receberam AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Não foram observadas diferenças significativas nas características demográficas e de doença dos participantes, à exceção de uma maior proporção de doentes com formas surto-remissão no grupo de mitoxantrona (42% vs 22%). (24) Neste ensaio verificou-se, após os tratamentos, uma menor taxa de surtos clínicos anual no grupo AHSCT em comparação com o grupo da mitoxantrona (0,19 vs. 0,6; OR 0,36; IC 95%, 0,15 a 0,88; $p=0,026$), porém, não houve diferença estatística na progressão da incapacidade entre os dois grupos. Para além disso, o AHSCT também demonstrou ser significativamente superior à mitoxantrona na redução da atividade na RM, uma vez que nenhum doente que realizou AHSCT (100%) apresentou lesões captantes de gadolínio (Gd) nos 4 anos de seguimento, enquanto 56% dos doentes que receberam mitoxantrona, apresentaram, pelo menos, uma lesão captante de Gd. Também o número de novas lesões T2 na RM cerebral aos 4 anos foi significativamente menor no grupo AHSCT (OR 0,21; IC de 95%, 0,1 a 0,48; $p=0,00016$). (24)

Os resultados promissores deste ensaio impulsionaram a realização de novos ensaios, sobretudo em doentes com esclerose múltipla surto-remissão (EMSR). (24) De seguida, serão apresentados os principais estudos subsequentes, podendo ser consultados os resultados clínicos e imagiológicos na Tabela 2.

Burt *et al.* (2019) desenvolveram um ensaio multinacional de fase III (MIST), multicêntrico, prospetivo e randomizado, incluindo 110 doentes com EMSR (EDSS entre 2,0 e 6,0), que foram randomizados para AHSCT, com condicionamento CyC-ATG, ou para DMT (melhor terapêutica disponível, sem especificação do fármaco). Dos 55 doentes randomizados para o grupo AHSCT, 52 receberam AHSCT. Porém, 31 doentes inicialmente no grupo DMT, que apresentaram atividade da doença, foram posteriormente escalonados para AHSCT, totalizando 83 doentes que receberam AHSCT. Após 5 anos de acompanhamento, verificaram-se taxas de NEDA de 78,5% (vs. 2,97% com DMT). A probabilidade de sobrevida

livre de progressão foi de 90% (vs 25% com DMT) e a probabilidade de sobrevida livre de surtos clínicos de 85% (vs 15% com DMT). Não foram relatadas novas lesões na RM no grupo AHSCT e, adicionalmente, verificou-se uma redução do volume médio lesional em T2 relativamente à linha de base, ao fim de 1 ano (12,33 cm³ vs 16,2 cm³), contrariamente ao observado no grupo DMT (15,14 cm³ vs 12,54 cm³). Só 1 doente iniciou DMT após AHSCT. (16)

Este estudo teve várias limitações, nomeadamente a transição de doentes do grupo DMT para AHSCT, bem como o facto de alguns dos DMTs de alta eficácia atualmente em uso, como o alemtuzumab, o ocrelizumab e a cladribina, não terem sido considerados por ainda não estarem disponíveis. (16)

Nash *et al.* (2015, 2017) desenvolveram um estudo de fase II multicêntrico, prospetivo, de braço único e sem ocultação (HALT-MS), que incluiu 25 doentes com EMSR, com EDSS entre 3,0 e 5,5. Destes, 24 foram submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG, juntamente com a seleção *ex vivo* CD34+ do enxerto de células-tronco. Após 5 anos de acompanhamento, verificaram-se taxas de NEDA de 69,2%. A probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 91,3%, a probabilidade de sobrevida livre de surtos clínicos de 86,9% e a probabilidade de sobrevida livre de atividade imagiológica de 86,3%. Só 1 doente iniciou DMT após AHSCT. (17,80)

Atkins *et al.* (2016) desenvolveram um ensaio clínico de fase II (MS-BMT) multicêntrico, prospetivo, de braço único, que incluiu 24 doentes, dos quais 12 apresentavam esclerose múltipla secundária progressiva (EMSP) e 12 apresentavam EMSR, com EDSS entre 3,0 e 6,0. Estes doentes receberam AHSCT de alta intensidade com Bu, CyC e ATG e foram submetidos a uma seleção *ex vivo* CD34+ das células-tronco. Após 3 anos de seguimento, verificaram-se taxas de NEDA de 69,6%. A probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 69,6%. Não foi observada nenhuma atividade inflamatória, através de surtos ou novas lesões em RM, havendo melhoria sustentada da EDSS em 35% dos doentes. Nenhum doente necessitou de DMT após AHSCT. (15)

Moore *et al.* (2019), desenvolveram um estudo de fase II, monocêntrico, prospetivo de braço único, que incluiu 35 submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG, dos quais 20 tinham EMSR e 15 tinham EMSP, com EDSS entre 2,0 e 7,0. Após 3 anos de acompanhamento, verificaram-se taxas de NEDA de 60% (70% para EMSR), com

probabilidade de sobrevida livre de progressão de 73% (88% para EMSR), probabilidade de sobrevida livre de surtos clínicos de 90% e probabilidade de sobrevida livre de atividade na RM de 86%. Foi documentada uma melhoria sustentada da EDSS em 13 (37%) doentes, 12 dos quais com EMSR. Só 2 doentes (6%) iniciaram DMT após AHSCT. (25)

Casanova *et al.* (2017) publicaram um estudo observacional, multicêntrico e retrospectivo, que incluiu 38 doentes, dos quais 28 tinham EMSR e 10 tinham EMSP, com EDSS médio de 5,3. Estes doentes foram submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Dos 38 doentes tratados com AHSCT, apenas 31 mantiveram acompanhamento por mais de 2 anos, verificando-se taxas de NEDA de 54,8% (72,7% EMSR vs 11,1% EMSP), ao longo do período de acompanhamento (média de 8,4 anos). A probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 77%, a probabilidade de sobrevida livre de surtos clínicos foi de 68% e a probabilidade de sobrevida livre de atividade de RM foi de 94%. Os principais resultados em termos de eficácia foram a redução acentuada de surtos clínicos em ambas as formas clínicas e a interrupção da progressão da incapacidade na EMSR: nenhum doente com EMSR apresentou agravamento da EDSS, sendo que 60% mostrou, pelo contrário, uma redução da incapacidade, enquanto 7 doentes com EMSP agravaram a EDSS. Durante o seguimento, 11 doentes (35%) necessitaram de DMT após AHSCT. (81)

Boffa *et al.* (2020) desenvolveram um estudo observacional monocêntrico e retrospectivo que incluiu 57 doentes com EMSR, no qual compararam AHSCT com condicionamento BEAM-ATG (n=25), com alemtuzumab (n=32). É importante referir que uma limitação deste estudo (possível enviesamento), consistiu no facto de os doentes tratados com AHSCT apresentarem previamente ao tratamento um EDSS superior, um maior número de surtos e um maior número de lesões captantes de Gd, não sendo, portanto, grupos equivalentes. Ainda assim, após 5 anos de acompanhamento, verificaram-se taxas de NEDA de 75% no grupo de AHSCT (vs. 56% com alemtuzumab). A probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 88% (vs. 94%), a probabilidade de sobrevida livre de surtos clínicos foi de 84% (vs. 69%) e a probabilidade de sobrevida livre de atividade em RM foi de 85% (vs. 59%). Ambos os grupos demonstraram uma melhoria significativa da EDSS, embora com diferenças estatisticamente significativas a favor do grupo AHSCT (p=0,035). Apenas 6 doentes (24%) necessitaram de DMT após AHSCT. (78)

Mariottini *et al.* (2021) realizaram um estudo observacional monocêntrico e retrospectivo, que incluiu 26 doentes com EMSP submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Após 5 e 10 anos de acompanhamento, verificaram-se taxas de NEDA de respetivamente 42% e

30%. A probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 42% (aos 5 anos) e 30% (aos 10 anos). Não foram relatados surtos clínicos ou atividade em RM, e nenhum doente iniciou DMT após AHSCT. (79)

Zhukovsky *et al.* (2021) realizaram um estudo observacional multicêntrico e retrospectivo, que incluiu 145 doentes com EMSR, no qual compararam AHSCT com condicionamento CyC-ATG (n=69), com alemtuzumab (n=75). Após 3 anos de acompanhamento, verificaram taxas de NEDA de 88% nos doentes tratados com AHSCT (vs. 37% com alemtuzumab), a probabilidade de sobrevida livre de progressão foi de 97% (vs. 82%), de sobrevida livre de surtos clínicos foi de 93% (vs. 70%) e de sobrevida livre de atividade de RM foi de 93% (vs. 55%). Apenas 5 doentes (7%) necessitaram de DMT após AHSCT. (77)

Considerando a heterogeneidade dos regimes de condicionamento e os vários fenótipos de EM dos doentes incluídos, Sormani *et al.* apresentou uma tentativa de integrar os resultados de vários estudos, através de um estudo de meta-análise, que incluiu 764 doentes. A probabilidade de progressão estimada foi de 17,1%, aos 2 anos, e 23,3%, aos 5 anos. A menor probabilidade de progressão aos 2 anos foi associada a uma maior proporção de doentes com EMSR ($p=0,004$). A percentagem estimada de doentes com NEDA aos 2 anos foi de 83% (70% a 92%) e aos 5 anos foi de 67% (59% a 70%), contrastando com a percentagem de doentes com EMSR que mantém NEDA após 2 anos de DMT (13% a 46%). (5)

No geral, conclui-se que o ASCHT fornece taxas de NEDA mais elevadas do que os DMT disponíveis à data dos estudos, podendo ser considerado uma alternativa potencialmente mais eficaz em doentes selecionados. (5)

Para além disso, as evidências emergentes sobre esta abordagem terapêutica indicam que o melhor perfil de benefício/risco dessa abordagem terapêutica pode ser obtido em doentes com EMSR agressiva e que ainda não acumularam um alto nível de incapacidade. (5,82)

Contudo, contrariamente aos estudos de AHSCT com intensidade mais baixa, que tendem a incluir apenas EMSR, os estudos de intensidade intermédia/alta, apesar de demonstrarem maior eficácia em doentes com EMSR, também demonstraram algum benefício nos doentes EMSP. (15,25,81) De destacar o papel do AHSCT na interrupção da progressão da incapacidade, estando muitas vezes, associado a uma melhoria da mesma. (15–17,25,77–79,81)

Por fim, foi demonstrado um papel importante na atividade imagiológica da doença, nomeadamente na redução do aumento de carga lesional em T2 e de novas lesões captantes de Gd. (25)

No entanto, regimes de intensidade diferentes, mostram efeitos distintos na atividade inflamatória e consequentemente nas lesões captantes de Gd: em regimes de alta intensidade, foi demonstrada uma supressão completa das lesões captantes de Gd em doentes com grande atividade documentada antes do AHSCT. (15) Em regimes de intensidade intermédia também foram relatadas reduções importantes e quase completas das lesões Gd+. (25,83) Em regimes de baixa intensidade, o número médio de lesões captantes de Gd diminuiu significativamente após o tratamento, porém não foi obtida uma supressão completa da atividade inflamatória, sugerindo que um regime de condicionamento de baixa intensidade não é capaz de anular completamente a atividade da RM. (20)

Tabela 2. Dados demográficos, protocolos e eficácia clínica/imagiológica dos estudos relativos ao AHSCT, publicados entre 2016 e 2020, com mais de 20 participantes. Adaptado de Bose G et al. (2021). (84)

Estudo	Tipo de estudo	Dados demográficos						Protocolo			Resultados					
		Nº doentes	Idade (média/mediana,anos)	Duração doença (média/mediana,anos)	Nº DMT prévios	EDSS base	% EMSR	Mobilização	Seleção ex-vivo	Regime de condicionamento	Follow-up (média/mediana,anos)	% Livre de surtos	% Livre atividade na RM	% Livre de progressão	% NEDA	% DMT após AHSCT
Burt (16)	Fase III	52	34 (18-54)	4,7 (0,75-14)	3 (1-7)	3 (1-7)	100%	CyC (2 g/m2) GCSF (5-10 µg/kg/d x 4)	Não	CyC-ATG	2,8	85,0%	NA	90,0%	78,5% aos 5 anos	2,0%
Nash (17)	Fase II	24	37 (IQR 31-42)	4,9 (IQR 2,5-7,3)	3 (IQR 2-4)	4,5 (IQR 4-5)	100%	GCSF (16 µg/kg/d x 4)	CD34+	BEAM-ATG	5,2	86,9%	86,3%	91,3%	69,2% aos 5 anos	4,0%
Atkins (15)	Fase II	24	34 (24-25)	5,8 (1-11)	2 (1 a 3+)	5 (3-6)	50%	CyC (4,5 g/m2) GCSF (10 µg/kg/dx10)	CD34+	Bu-CyC-ATG	6,7	100,0%	100,0%	69,6%	69,6% aos 3 anos	0,0%
Moore (25)	Fase II	35	37 (21-55)	8,6 (1-38)	4 (2-7)	6 (2-7)	57%	CyC (2 g/m2) GCSF (10 µg/kg/dx10)	Não	BEAM-ATG	3	90,0%	86,0%	73,0%	60% aos 3 anos	6,0%
Casanova (81)	Observacional	31	36,7 (+/- 9,1)	9,5 (+/-7,6)	2 (1-4)	5,3 (+/-1,2)	71%	CyC (4 g/m2) GCSF (5 µg/kg/d até colheita)	Não	BEAM-ATG	8,4	68,0%	94,0%	77,0%	54,8%	35,0%
Boffa (78)	Observacional	25	32 (+/- 9,9)	9,5 (+/-5,4)	3 (IQR 2-4)	6 (IQR 4,5-7)	100%	CyC (4 g/m2) GCSF (5 µg/kg)	Não	BEAM-ATG	4,2	84,0%	85,0%	88,0%	75% aos 5 anos	24,0%
Mariottini (79)	Observacional	26	37 (27-58)	9 (4-25)	3 (1-5)	6 (4-7,5)	0%	CyC (4 g/m2) GCSF (5-12 µg/kg/d até colheita)	Não	BEAM-ATG	8,25	100,0%	100,0%	30,0%	30% aos 10 anos	NA
Zhukovsky (77)	Observacional	69	30 (IQR 26-37)	6,4 (+/-5,7)	2 (IQR 1-3)	3 (IQR2-4)	100%	CyC (2 g/m2) GCSF (5-10 µg/kg/d x 6-7)	Não	CyC-ATG	2,8	93,0%	93,0%	97,0%	88% aos 3 anos	7,0%

AHSCT, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas; ATG, soro anti-timocitário; BEAM, carmustina, etoposide, ara-citarabina e melfano; Bu, bussulfano; CyC, ciclofosfamida; DMT, terapêutica modificadora de doença ; EDSS, *expanded disability status scale* ; GCSF, fator estimulador de colónias de granulócitos (filgrastim); IQR, interquartil; NA, não-aplicável; NEDA, sem evidência de atividade de doença, EMSR, esclerose múltipla surto-remissão; RM, ressonância magnética

i. Impacto na atrofia cerebral

Geralmente, doentes com EM apresentam índices mais elevados de perda de volume cerebral do que indivíduos saudáveis. A atrofia cerebral está relacionada com a neurodegeneração, que por sua vez também está relacionada com o dano inflamatório e, com efeito, tratamentos para a EM têm demonstrado benefício na redução da progressão da atrofia cerebral. (85)

No estudo de Nash *et al.*, a atrofia cerebral agravou significativamente nos primeiros 6 meses após o AHSCT, estabilizando após o terceiro ano. (17) No estudo de Atkins *et al.*, também se verificou agravamento da atrofia cerebral nos primeiros 6 meses após AHSCT, estabilizando a partir dos 24 meses. (15) O mesmo agravamento inicial também se verificou na coorte de Mariottini *et al.*, porém 55% dos doentes tiveram taxas de atrofia semelhantes a controlos saudáveis. (79) No estudo de Moore *et al.*, foi utilizado um método alternativo para estimar a atrofia cerebral através da mudança do volume do ventrículo lateral, com 18 dos 24 participantes a evidenciarem valores de mudança abaixo do limiar patológico após AHSCT. (25,86)

Uma vez que as técnicas de medição da atrofia cerebral não estão padronizadas, torna-se difícil a comparação dos dados obtidos. De qualquer forma, parece existir um agravamento imediato na atrofia cerebral, sobretudo nos primeiros 6 meses após o AHSCT, que tende a estabilizar apenas após os 3 anos. (15,17,25,79,86)

Foram propostas explicações para esta perda de volume cerebral observada logo após AHSCT: (i) "pseudo-atrofia", ou seja, perda de volume pela redução do edema após a resolução da inflamação no parênquima cerebral e em resultado do tratamento; (ii) degeneração do tecido cerebral em continuidade a um processo já presente antes do tratamento; ou (iii) aceleração da atrofia pela neurotoxicidade associada ao transplante. (87)

No sentido de esclarecer o processo subjacente à perda de volume cerebral, um estudo recente avaliou o efeito do AHSCT de alta intensidade em 19 doentes (12 EMSR e 7 EMSP). Este estudo revelou que imediatamente após o transplante, se verificou uma aceleração da atrofia cerebral, provavelmente associada à toxicidade relacionada com o tratamento (bussulfano) e à degeneração dos tecidos "comprometidos" - medida pela carga da lesão ponderada em T1. A velocidade de atrofia foi diminuindo progressivamente ao longo de

aproximadamente 2,5 anos, para valores semelhantes aos esperados no envelhecimento normal, sugerindo que a interrupção da atividade inflamatória na EM pode reduzir a degeneração e a atrofia secundária. Não houve evidência de que a resolução do edema tenha contribuído para a perda de volume. (87)

ii. Impacto em biomarcadores séricos e do líquido cefalorraquidiano

Os biomarcadores clássicos e relevantes do LCR na EM, são as bandas oligoclonais (BOC) e o índice de imunoglobulina G (IgG). (88)

O estudo retrospectivo de Larsson *et al.* que incluiu 46 doentes EMSR tratados com AHSCT de intensidade intermédia, demonstrou que 1500 dias após o transplante, as BOC permaneceram detetáveis em 50% dos doentes. Porém, o índice de IgG foi diminuindo progressivamente ao longo do tempo. (88) Da mesma forma, a persistência de BOC após AHSCT também foi demonstrada pelo grupo de Nash. Neste caso, 2 anos após o AHSCT, as BOC permaneceram detetáveis em 75% dos doentes, embora com redução significativa do número de bandas. Simultaneamente, verificou-se uma redução dos níveis de IgG no LCR. (17) Desta forma, concluiu-se que a síntese de imunoglobulina intratecal após o tratamento, diminuiu e acabou por estabilizar numa grande parte dos doentes, ao longo do tempo. Contrariamente, as BOC persistiram detetáveis numa porção significativa de doentes, questionando o eventual valor prognóstico a longo prazo deste marcador. (88)

Os avanços tecnológicos revelaram novos biomarcadores do soro e do LCR, sendo que a sua utilidade está a ser investigada em várias doenças neurológicas, nomeadamente na EM. Os biomarcadores séricos apresentam vantagens sobre os do LCR na medida em que evitam a realização de punções lombares, permitindo um maior conforto, redução da morbilidade, custo e tempo. (89,90) Neste contexto, são particularmente relevantes os neurofilamentos (NfL), componentes do citoesqueleto neuronal que são libertados no compartimento extracelular após dano axonal, traduzindo a presença de lesão neuronal. (90,91) Podem ser testados no soro ou no LCR e estão relacionados temporalmente com novos surtos e lesões captantes de Gd na RM, bem como com atrofia cerebral a longo prazo. Assim, a sua medição no âmbito do tratamento com AHSCT é, de todo, relevante. (89,90,92,93)

O estudo de Thebault *et al.* avaliou o efeito de AHSCT de alta intensidade nos níveis de NfL detetados em amostras de soro e LCR de 23 doentes com EM (11 EMSR e 12 EMSP). Neste estudo verificou-se que os níveis basais de NfL em doentes com EM eram significativamente elevados em relação aos controlos saudáveis, tanto no soro ($p=0,001$) como no LCR ($p=0,001$). Após o AHSCT, os níveis elevados de NfL pré-tratamento foram reduzindo significativamente no soro ($p=0,0023$) e no LCR ($p=0,0068$) e, aos 12 meses, apresentavam valores semelhantes aos observados nos controlos. Os níveis séricos e no LCR de NfL estavam altamente correlacionados ($r=0,81$, $p<0,0001$). (94) Também o estudo de Larsson *et al.* relativo ao transplante de intensidade intermédia, mostrou que os níveis de NfL no LCR permanecem inicialmente elevados em 24% dos doentes, mas em nenhum dos doentes com mais de 1.500 dias de acompanhamento, indicando possivelmente alguma toxicidade inicial após o transplante, seguida de estabilidade posteriormente. (88)

Foi ainda demonstrada a associação de níveis basais persistentemente mais elevados de NfL, após AHSCT, a piores resultados em parâmetros como o EDSS, cognição, qualidade de vida e alterações na RM. (94)

Assim sendo, os níveis de NfL no soro e no LCR refletem não só a resposta ao tratamento, como também a gravidade da doença. (89)

iii. Impacto na cognição, fadiga e qualidade de vida

O crescente reconhecimento do impacto da fadiga, cognição e qualidade de vida no bem-estar do doente e a sua valorização como indicadores de eficácia dos fármacos para a EM, explicam a incorporação mais recente da sua avaliação quantitativa e qualitativa nalguns dos estudos clínicos em análise (15–17,25,95,96)

No ensaio MIST de Burt *et al.*, os doentes após AHSCT mostraram uma melhoria das pontuações no primeiro ano para o *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC) (aumentou 0,32 em 1 ano) bem como das pontuações do *9-Hole Peg Test* (9-HPT) (diminuiu de 30,81 segundos para 26 segundos, em 6 meses, e 24 segundos, num ano) e do *Timed 25-Foot Walk* (T25W) (diminuiu de 6,48 segundos para 5,88 segundos, em 6 meses, e 6,01 segundos, num ano), contrariamente aos resultados do grupo DMT, no qual houve um agravamento da pontuação no primeiro ano para o MSFC (diminuiu 0,32 em 1 ano) bem como

das pontuações do 9-HTP (aumentou de 24,69 segundos para 26,28 segundos, em 6 meses, e 25,64 segundos, num ano) e do T25W (aumentou de 5,59 segundos para 7,01 segundos, em 6 meses, e 7,96 segundos, num ano). Excepcionalmente, os scores médios do *Paced Auditory Serial Addition Test* (PASAT) não mostraram diferenças significativas entre os grupos. (16)

No estudo de Nash *et al.*, o MSFC e a *Multiple Sclerosis Impact Scale* (MSIS-29) foram realizados antes do transplante, aos 6 meses, e depois anualmente até o final do estudo. Ambos melhoraram significativamente desde o início até ao terceiro ano ($p=0.011$ e $p=0.016$), porém esta melhoria deixou de ser estatisticamente significativa a partir do quinto ano após o transplante. (17)

O estudo de Atkins *et al.* relatou o impacto da fadiga nos primeiros três anos em doentes submetidos a AHSCT, avaliando a fadiga física, cognitiva e social, através da *Fatigue Impact Scale* (FIS) e a FIS modificada (MFIS). Após AHSCT, esta escala mostrou melhorias significativas em todos os domínios logo nos seis meses após AHSCT com redução de 36%, e permaneceu relativamente constante nos três anos seguintes. (15,95)

A coorte australiana relatada por Moore *et al.*, avaliou a qualidade de vida através da *Multiple Sclerosis Quality of Life 54* (MS-QoL). Para os doentes com EMSR, tanto os scores de saúde física como mental melhoraram em relação à linha de base, durante três anos após AHSCT. Por outro lado, nos doentes com EMSP, os scores de saúde mental também melhoraram nos primeiros três anos de acompanhamento, mas os scores de saúde física apenas melhoraram no primeiro ano. (25)

O estudo de Giedraitiene *et al.*, mais direcionado à avaliação a cognição após AHSCT, veio reforçar a noção de melhoria da mesma a longo prazo. Neste estudo, através da *Brief International Cognitive Assessment for Multiple Sclerosis* (BICAMS), foram analisados os três domínios cognitivos. A pontuação do *Symbol Digit Modality Test* (SDMT) foi ligeiramente menor no 3º mês após AHSCT (estatisticamente não significativo), e maior no 12º mês após transplante. Também a pontuação do *Brief Visuospatial Memory Test-Revised* (BVMTR), foi ligeiramente menor no 3º mês após AHSCT (estatisticamente não significativo), e ao 12º mês não diferia muito do pré-transplante. A pontuação do *California Verbal Learning Test Second Edition* (CVLT) foi significativamente mais favorável ao 12º mês após AHSCT do que antes do tratamento. Os autores comparam este impacto negativo a curto prazo na cognição, com

a observada em situações de utilização de quimioterapia no tratamento do cancro, comumente chamado “*chemobrain*”, e que também parece diluir-se a longo prazo. (96)

Em suma, o AHSCT demonstrou melhorias a longo prazo a nível da fadiga, cognição e qualidade de vida. (96)

d) Avaliação da segurança - mortalidade e morbilidade

Uma das principais preocupações ao realizar AHSCT é o risco de eventos adversos (EA) associado, normalmente relatados e classificados de acordo com a *National Cancer Institute's Common Toxicity Criteria*. (97)

Na maioria dos estudos publicados e planeados foram critérios de exclusão para esta terapêutica quaisquer comorbilidades que impeçam a administração segura do AHSCT, pois aumentam o risco de TRM. Foram exemplos a infeção ativa, disfunção hepática, doença cardíaca, patologia pulmonar, doença renal em estadio terminal, gravidez ou necessidade de tratamento concomitante com outro DMT. Ainda assim, mesmo na ausência destas condicionantes e perante o “doente ideal”, o AHSCT é um tratamento de risco que apresenta problemas de segurança não só pela toxicidade imediata, mas também pela supressão imunológica a longo prazo. (7)

Os protocolos de segurança e os EA descritos em estudos clínicos e observacionais publicados recentemente são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Protocolo de segurança e efeitos adversos do AH SCT em estudos publicados entre 2016 e 2020, com mais de 20 participantes. Adaptado de Bose G *et al.* (2021). (84)

Estudo	Nº doentes	Follow-up (média/mediana, anos)	Regime de condicionamento	Profilaxia de infeções	Eventos Adversos Severos					
					TRM	Citopenias	Infeções	Reativação viral	Autoimunidade secundária	Malignidade
Burt (16)	83	2	CyC-ATG	Aciclovir, Fluconazol, Trimetropim-Sulfametoxazol	0	13 eventos	31 eventos	7 eventos	2 PTI 4 Tiroidites	0
Nash (17)	24	5	BEAM-ATG	Aciclovir, Fluconazol, Trimetropim-Sulfametoxazol	0	16 doentes (64%)	14 doentes (56%)	3 doentes (12%)	NA	NA
Atkins (15)	24	6,7	Bu-CyC-ATG	Valaciclovir, Fluconazol, Trimetropim- Sulfametoxazol	1	24 doentes (100%)	14 doentes (58%)	6 doentes (26%)	5 Tiroidites 1 PTI	0
Moore (25)	35	3	BEAM-ATG	Cuidados de apoio básicos	0	29 eventos	19 eventos	5 eventos	1 Tiroidite 1 Microcolite	0
Casanova (81)	31	8,4	BEAM-ATG	Aciclovir, Trimetropim-Sulfametoxazol	0	NA	NA	NA	NA	2 mama 1 colo do útero
Boffa (78)	25	4,2	BEAM-ATG	Aciclovir, Trimetropim-Sulfametoxazol	0	16 eventos	24 eventos	4 eventos	1 Tiroidite 1 Miosite 1 Asma	1 MGUS
Mariottini (79)	26	8,25	BEAM-ATG	NA	0	NA	8 doentes (31%)	3 doentes (12%)	2 Tiroidites	1 síndrome mielodisplásico
Zhukovsky (77)	69	2,8	CyC-ATG	Aciclovir, Trimetropim-Sulfametoxazol	0	40 eventos	81 eventos	21 eventos	13 Tiroidites 1 HGG 1 Psoríase	0

AH SCT, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas; NA, não-aplicável; HGG, hipogamaglobulinémia; PTI, trombocitopenia imune primária; MGUS, gamapatia monoclonal de significado indeterminado; TRM, mortalidade relacionada com o tratamento; EDSS, *expanded disability status scale*; ATG, soro anti-timocitário; BEAM, carmustina, etoposide, ara-citarabina e melfano; Bu, bussulfano; CyC, ciclofosfamida

No estudo de Burt *et al.*, em que 83 doentes receberam AHSCT utilizando condicionamento CyC-ATG, não foi relatada TRM durante os 5 anos de acompanhamento. No grupo AHSCT, não foi descrito nenhum caso de toxicidade de grau 4 na escala de Critérios de Terminologia Comum para Efeitos Adversos, porém foram descritas 72 toxicidades de grau 3 (100%), incluindo predominantemente citopenias. No total, foram descritas 13 citopenias e 31 infeções, que incluíram infeções do trato respiratório superior (n=16), infeções do trato urinário (n=6), diarreia por *clostridium difficile* (n=2) e reativação de vírus varicela-zoster (VZV) (n= 7). Observaram-se ainda dois casos de trombocitopenia imune primária, 3 casos de hipertiroidismo e 1 caso de hipotiroidismo. No grupo DMT foram descritas 15 infeções do trato respiratório superior, 8 infeções do trato urinário e 2 casos de reativação de VZV. Foi descrito um caso de um nódulo tiroideu. (16)

No estudo de Nash *et al.* no qual foi efetuado AHSCT com condicionamento BEAM-ATG em 24 doentes, não se verificou TRM durante os 5 anos de acompanhamento. No entanto, três doentes morreram durante este período por questões não relacionadas com o procedimento: 2 casos foram atribuídos a progressão da EM e o terceiro a paragem cardiorrespiratória. Os EA descritos até aos 3 anos foram consistentes com os efeitos tóxicos associados ao transplante, incluindo predominantemente citopenias e infeções. Neste estudo, foram descritas toxicidades de grau 4 em 100% dos doentes (todos até aos 3 anos) e toxicidades de grau 3 em 92% dos doentes. No total, foram descritos 16 doentes com citopenia, 14 com infeções e 3 com reativações virais. (17,80)

No estudo de Atkins *et al.*, no qual foi efetuado AHSCT de alta intensidade com Bu, CyC e ATG em 24 doentes, foi relatada 1 TRM (4,2%) por síndrome de obstrução sinusoide com sépsis subsequente por *Klebsiella*, 62 dias após AHSCT. Outro doente também desenvolveu a mesma síndrome, com recuperação posterior. Estes eventos motivaram a alteração do protocolo com mudança na dose de bussulfano. No total, foram descritos 24 doentes com citopenias (100%), 14 doentes com infeções (58%), 6 reativações virais por VZV (26%). Foram ainda observados 6 doentes com autoimunidade secundária (26%). (15)

O estudo de Moore *et al.* incluiu 35 submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Neste estudo não houve TRM durante os 3 anos de acompanhamento. Foram relatadas 15 toxicidades de grau 3, nos primeiros 100 dias após transplante, e 14 após os 100 primeiros dias. No geral, foram descritas 29 citopenias, 19 infeções, 5 reativações virais (4 por VZV), 1 trombose venosa profunda, uma microcolite e uma tiroidite de Hashimoto. (25)

No estudo de Casanova *et al.* foram submetidos 38 doentes a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Neste estudo não foi relatado TRM durante o período de acompanhamento (média de 8,4 anos). No entanto, um doente morreu por pneumonia de aspiração (EDSS de 9.5), 13 anos após AHSCT. Toxicidades de grau 4 por toxicidade hepática foram descritas em apenas 4 doentes (10,5%). Toxicidades de grau 3 também foram descritas em apenas 4 doentes, correspondendo a toxicidade intestinal e toxicidade cutânea. No seguimento a longo prazo, foram diagnosticados três tumores sólidos: dois carcinomas de mama e um do colo do útero. (81)

No estudo de Boffa *et al.*, 25 doentes foram submetidos a AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Não ocorreu TRM durante os 5 anos de acompanhamento. Os EA descritos nos primeiros 100 dias foram consistentes com os efeitos tóxicos associados ao transplante, incluindo predominantemente citopenias e infeções. No total, foram descritas 16 citopenias, 24 infeções e 4 reativações virais (2 CMV, 1 herpes simplex tipo 1 (HSV1) e 1 VZV). No seguimento a longo prazo, apenas foram descritos: 1 caso de tiroidite autoimune, 1 caso de miosite e 1 caso de asma. Houve ainda 1 doente que desenvolveu necrose avascular secundária ao uso de corticóides e 1 doente desenvolveu gamapatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS). Por outro lado, no grupo tratado com alemtuzumab (n=32), foram descritas 1 citopenia, 3 infeções e 3 reativações virais (HSV1). Os EAs tardios foram mais comuns, incluindo 9 casos de tiroidite autoimune, 1 caso de asma, 2 casos de trombocitopenias auto-imunes e 2 casos de psoríase. (78)

O estudo de Mariottini *et al.* incluiu 26 doentes em que foi realizado AHSCT com condicionamento BEAM-ATG. Não se verificou TRM durante os 10 anos de acompanhamento nem foi descrita nenhuma complicação de elevado risco de vida. No total, 8 doentes desenvolveram infeções (31%) e 3 desenvolveram reativações virais por VZV (12%). A longo prazo apenas foram descritos 2 casos de tiroidite autoimune (8%) e 1 caso de síndrome mielodisplásica (4%). (79)

No estudo de Zhukovsky *et al.*, 69 doentes foram submetidos a AHSCT e condicionamento CyC-ATG. Neste estudo não ocorreu TRM durante os 3 anos de acompanhamento. Nos primeiros 100 dias, toxicidades de grau 4 ocorreram em 2,89% dos doentes e toxicidades de grau 3 ocorreram em 69,5%, sendo a neutropenia febril o evento adverso mais comum (58%). No seguimento a longo prazo, apenas foi descrita uma toxicidade de grau 3 em 1 doente (1,4%) – neuroborreliose. No geral, foram descritas 40 citopenias, 81 infeções, 21 reativações virais (5,8% VZV) e 15 doentes manifestaram patologias autoimunes secundárias (13

patologia da tiróide, 1 psoríase, 1 hipogamaglobulinémia). No grupo tratado com alemtuzumab (n=75), nos primeiros 100 dias nenhuma toxicidade de grau 3 foi mencionada, porém a longo prazo foram descritas toxicidades de grau 3 em 5 doentes (6,7%) – 4 trombocitopenias imunes, 1 cancro da mama. No geral, foram descritos 5 doentes com reativação viral por VZV (6,7%) e 35 doentes que manifestaram patologia autoimune (31 com patologia da tiróide). (77)

Independentemente do protocolo, os estudos indicam que logo após AHSCT os eventos adversos imediatos mais comuns e esperados dizem respeito à toxicidade, alergias, febre neutropénica, reativações virais, infeção de órgãos com potencial para sépsis, sendo mais frequentes do que com DMT de alta eficácia, como o alemtuzumab. Contudo, o risco mais preocupante é a mortalidade associada ao tratamento, que ocorreu apenas num doente submetido a um protocolo de alta intensidade, motivando uma mudança na dose do bussulfano nesse estudo para que mais nenhum TRM fosse observado. (77,78)

A longo prazo, a malignidade e a autoimunidade secundária (sobretudo tiroidite) são os principais efeitos adversos, e foram relatadas em 3,2% e 5%, respetivamente, após AHSCT, que mesmo assim é menor do que as taxas relatadas para o alemtuzumab. (22)

Nas mulheres, o alto risco de menopausa prematura e infertilidade também é uma questão relevante. Este risco é dependente da idade em que se faz o transplante (elevado se a doente tiver mais de 30 anos) e da intensidade do regime de condicionamento. (98) No entanto, conceber após o transplante é possível e 15 gravidezes foram descritas numa análise retrospectiva avaliando 324 mulheres tratadas para doenças autoimunes. (99) De acordo com os poucos dados disponíveis, a fertilidade masculina parece ser menos prejudicada por este procedimento. Num pequeno estudo envolvendo quatro homens tratados com AHSCT para doenças autoimunes mostrou que com CyC-ATG, os níveis de testosterona reduziram em comparação com os valores basais, mas permaneceram dentro dos valores normais em três doentes. (100) O aconselhamento sobre os efeitos colaterais no sistema reprodutivo e a adoção de estratégias de preservação da fertilidade podem oferecer uma solução para este problema. (7)

Desde 1995, registos como o EBMT e o Comité de Trabalho de Doenças Autoimunes do Centro de Pesquisa Internacional de Transplante de Medula e Sangue (*Center for International Blood and Marrow Transplant Research - CIBMTR*), permitiram uma análise dos

dados, de forma a orientar estudos que conduzam a uma melhor interpretação dos resultados. Nesse sentido, a meta-análise de Sormani *et al.*, baseada em 15 estudos que reportam a utilização de AHSCT em EM (independentemente da forma e protocolo de condicionamento), demonstrou que o TRM diminuiu ao longo do tempo, de 3,6% antes de 2005 para 0,3% após 2005, em doentes submetidos a AHSCT. (5) Também o estudo de Muraro demonstrou que, em comparação com os dados publicados antes de 2016, o TRM reduziu muito de 7,3% entre 1995 e 2000, 1,3% entre 2001 e 2007, 0,7% entre 2008 e 2016 e 0,2% nos estudos mais recentes. (7,22,32)

Fatores associados à mortalidade incluem a idade avançada, EDSS basal mais elevada, curso progressivo da doença e regimes de alta intensidade (TRM 3,13% vs. 0,97% respetivamente para intensidade alta vs. baixa-intermediária). (5,22,101) Desta forma, a seleção criteriosa dos doentes em termos de idade, nível de incapacidade e comorbilidades, além de permitir melhores cuidados de suporte e protocolos de condicionamento mais refinados, provavelmente conduzirá a uma melhoria do perfil de segurança. (7)

e) Recomendações atuais - seleção de doentes

A publicação dos resultados obtidos com a utilização de ASCHT em estudos observacionais e análises de registos têm permitido aumentar o conhecimento acerca desta alternativa terapêutica em EM, possibilitando o correto desenho de futuros *Randomized controlled trials* (RCT) que serão fundamentais para determinar a seleção do “paciente ideal” para esta terapêutica. Um exemplo paradigmático é o estudo de Muraro *et al.* em que se verificou que, dos 239 doentes avaliados após AHSCT, o agravamento da EDSS era mais provável em doentes mais velhos, que tinham formas progressivas de EM e que tinham sido submetidos a 3 ou mais DMT com falência. (22)

Os critérios de inclusão para os ensaios não observacionais publicados recentemente, bem como para três RCT que serão realizados, estão resumidos na Tabela 4. (7,15–17,25,102–105) Destaca-se como critério de exclusão um EDSS superior a 6.0. O limite superior de idade para inclusão nesses estudos é 50-60 anos, sendo necessário documentar “evidência de atividade da doença” (clínica ou radiológica) nos dois anos anteriores, ou então, agravamento da EDSS em 1 ou 1,5 anos antes do AHSCT, sob DMT. (7,15–17,25,102–105)

Tabela 4. Critérios dos estudos publicados entre 2016 e 2020 e dos estudos planejados para o futuro. Adaptado de Bose G *et al.* (2021). (84)

Estudo	Tipo de estudo	Idade (anos)	Forma de EM	EDSS base	Atividade da doença durante DMT	Critérios de exclusão
Burt (16)	Fase III	18-55	EMSR	2,0-6,0	≥ 2 surtos , no último ano , 3 surtos , nos últimos 2 anos, ou agravamento da EDSS no último ano e meio	Comorbilidades, infecção activa, determinados DMTs prévios
Nash (17)	Fase II	18-60	EMSR	3,0-5,5	≥2 surtos no último ano e meio, associado ao aumento da EDSS	Comorbilidades, duração da EM >15 anos
Atkins (15)	Fase II	18-50	EMSR EMSP	3,0-6,0	≥2 surtos, ou 1 surto e 1 lesão Gd+ separadas no tempo, no último ano	Comorbilidades, infecção activa
Moore (25)	Fase II	18-60	EMSR EMSP	2,0-7,0	≥1 surto ou lesão Gd+, ou agravamento EDSS, no último ano	Comorbilidades
RAM-MS (103)	Fase III RCT	18-50	EMSR	0,0-5,5	≥1 surto e ≥1 Gd+, no último ano, ou ≥ 3 lesões T2 novas/aumentadas	Comorbilidades, infecção activa, gravidez, determinados DMTs prévios, abuso de substâncias
BEAT-MS (104)	Fase III RCT	18-55	EMSR EMSP	2,0-5,5	≥2 surtos ou ≥ 2 lesões RM (Gd+ ou nova lesão T2) nos últimos 36 meses, com pelo menos 1 a ocorrer no prazo de 1 ano	Comorbilidades, infecção activa, gravidez, determinados DMTs prévios, AHSTC prévio
STAR-MS (105)	Fase III RCT	16-55	EMSR	0,0-6,0	≥2 surtos ou 1 surto e uma lesão Gd+/ lesão T2 nova, >3 meses antes ou depois do seu início	Comorbilidade, infecção activa, gravidez, determinados DMTs prévios, duração da EM >10 anos, AHSTC prévio
COAST (102)	Fase II RCT	18-55	EMSR	0,0-6,0	≥2 surtos no último ano, ou 1surto no último ano e uma lesão Gd+ (>3 mm) > 3 meses antes ou depois do surto, ou 2 novas lesões T2, ou sinais contínuos de atividade na RM nos últimos seis meses (lesão Gd+ ≥ 3 mm no último ano ou > 5 novas lesões T2), ou doentes que suspendem natalizumab e : novas lesões T2 ou Gd , nos 6 meses após interrupção, ou ≥ 1 tratamento que falhou antes do natalizumab	Comorbilidade, infecção activa, gravidez, determinados DMTs prévios, duração da EM >10 anos, AHSTC prévio

RCT, *randomized clinical trials*; AHSTC, transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas; EMSR, esclerose múltipla surto-remissão; EMSP, esclerose múltipla secundária progressiva; EDSS, *expanded disability status scale*; Gd, gadólio; RM, ressonância magnética; EM, esclerose múltipla; DMT, terapêutica modificadora de doença

As últimas recomendações do EBMT (7) sugerem que idealmente o AHSTC deve ser oferecido a:

- Doentes com EMSR “altamente ativa” com surtos frequentes e lesões inflamatórias na RM (pelo menos 2 surtos clínicos, ou um surto clínico e lesões captantes de Gd ou novas lesões T2 em RM num ponto de tempo separado, nos 12 meses anteriores), apesar do uso de uma ou mais linhas de DMTs aprovados. As evidências destacam o potencial deste tratamento em doentes que são capazes de deambular independentemente ($EDSS \leq 5.5$), que têm menos de 45 anos e cuja duração da doença é inferior a 10 anos, permitindo atuar numa fase mais inflamatória da doença e simultaneamente reduzir o risco associado às comorbilidades típicas de idades mais avançadas. (7)

- Doentes com EM "maligna" que desenvolveram incapacidade grave (agravamento da EDSS) nos últimos 12 meses e, dado o potencial de incapacidade irreversível, podem ser considerados mesmo antes de falhar o curso completo de DMT. (7,31,106,107)
- Doentes com EMSP ou EM primária progressiva (EMPP), se a atividade inflamatória ainda for evidente (surto clínico, lesões ativas em T1 ou aumento da carga lesional em T2) e a progressão de incapacidade tenha sido documentada nos 12 meses anteriores. (7) Este facto foi corroborado pelo estudo EXPAND (siponimod vs placebo), que reforçou o papel da inflamação contínua na fase progressiva crónica da EM. (108)
- Em idade pediátrica são preferidos tratamentos menos tóxicos, porém o transplante pode ser considerado se a doença inflamatória se mostrar disruptiva apesar da terapêutica. (7)

Em suma, o AHSCT, deve ser oferecido a doentes mais jovens, com menos comorbilidades, menor duração da doença, menor EDSS e evidência de doença na fase inflamatória ativa, com evolução rápida e consequentemente doença agressiva ou refratária aos DMT de elevada eficácia disponíveis, que traduzam um prognóstico potencialmente mais desfavorável. (7,109–111)

f) Recomendações atuais - seleção do protocolo

Os principais centros responsáveis pelo impulsionamento de AHSCT desenvolveram os seus próprios protocolos de tratamento a partir da sua experiência, tendo por base o equilíbrio entre os benefícios e os riscos associados ao AHSCT.

Como referido anteriormente, o objetivo do AHSCT é tratar uma doença refratária aos DMT disponíveis, e assim tentar atingir o NEDA em doentes com EM altamente ativa ou com potencial para desenvolver doença agressiva, idealmente antes de passarem para a fase em que o agravamento da incapacidade é menos provável de ser interrompido. Simultaneamente, o risco do procedimento deve ser minimizado o máximo possível, sendo essencial para tal uma adequada seleção do doente. São por isso fatores de decisão na escolha do doente a

que este tratamento pode ser oferecido, a idade, a duração e forma de EM, o número e tipo de DMT realizado anteriormente, a EDSS basal e a presença de comorbilidades. (7)

O processo de mobilização é relativamente semelhante entre todos os estudos relatados recentemente. A colheita das células-tronco é preferencialmente efetuada por leucaferese de sangue periférico. (30)

O regime de condicionamento é também uma etapa essencial para o sucesso e eficácia do AHSCT. Vários estudos usaram BEAM-ATG, portanto, algumas comparações podem ser efetuadas: em estudos apenas com doentes com EMSR, pode-se esperar taxas mais altas de NEDA do que em estudos em que são incluídos também de EMSP. Isto é o que acontece quando comparamos o estudo de Nash e o estudo de Boffa, que incluíram apenas doentes com EMSR e obtiveram taxas de NEDA de 69% e 75%, respetivamente, vs. os estudos de Casanova e Moore, que incluíram doentes com EMSR e EMSP e que obtiveram taxas de NEDA de 55% e 60%, respetivamente. (17,25,78,81) Como o regime de condicionamento CyC-ATG não foi usado para tratar doentes com EMSP, não é possível estabelecer comparações. No entanto, tanto o estudo de Burt como a coorte de Zhukovsky usaram esse protocolo em doentes com EMSR com níveis basais de EDSS medianos mais baixos de 3,0, e alcançaram valores elevados de NEDA (78,5% e 88%, respetivamente). (16,77) Ou seja, pelo menos em comparação com DMTs (NEDA de 2,97% e 37%, respetivamente), incluindo alemtuzumab, os resultados do AHSCT são superiores. (16,77)

Os RCT planeados que usam um protocolo de baixa intensidade incluem RAM-MS (103), COAST (102) e STAR-MS (105), selecionará apenas doentes com EMSR e com EDSS entre 0 e 5,5 (ou 6,0 se durante um surto), enquanto que o BEAT-MS (104) utilizará um regime de intensidade intermediária de BEAM-ATG e incluirá doentes com EMSP e EDSS ativos de 2,0 a 5,5. (102–105) O acompanhamento a longo prazo desses doentes será importante para avaliar se os protocolos de intensidade inferior ou intermediária têm uma resposta duradoura e/ou problemas de segurança tardios. Todos os RCT planeados incluem métricas de atrofia cerebral e avaliações funcionais. A análise de biomarcadores séricos está apenas incluída no protocolo BEAT-MS. (104)

g) Perspetivas futuras

Embora seja claro que a atividade clínica e da ressonância magnética em doentes com EMSR “altamente ativa” pode ser suprimida com o uso de AHSCT, ainda não há estudos prospetivos randomizados de fase III que demonstrem a eficácia do AHSCT em comparação com as terapias convencionais. (7)

Desta forma, permanece a necessidade de realizar mais estudos comparativos entre AHSCT e outras terapias de alta eficácia. Ensaio clínico atuais, projetados para responder a essas e outras questões, estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Desenho dos futuros RCT relativos ao AHSCT na esclerose múltipla. Adaptado de Sharrack B et al. (2020). (7)

Estudo	Tipo de estudo	País	Regime de condicionamento	Fármaco a comparar	Tamanho da amostra	Idade (anos)	Forma de EM	EDSS Base
RAM-MS (103)	Fase III RCT	Dinamarca, Suécia, Noruega, Holanda	CyC+ATG	Alemtuzumab, ocrelizumab, cladribina	100	18-50	EMSR	0,0-5,5
BEAT-MS (104)	Fase III RCT	Estados Unidos, Reino unido	BEAM+ATG	Alemtuzumab, ocrelizumab, natalizumab, rituximab	156	18-55	EMSR EMSP	2,0-5,5
STAR-MS (105)	Fase III RCT	Reino Unido	CyC+ATG	Alemtuzumab, ocrelizumab	198	16-55	EMSR	0,0-6,0
COAST (102)	Fase II RCT	Alemanha	CyC+ATG	Alemtuzumab, ocrelizumab	50	18-55	EMSR	0,0-6,0

RCT, *randomized clinical trials*; ATG, soro anti-timocitário; BEAM, carmustina, etoposide, ara-citarabina e melfano; CyC, ciclofosfamida; EMSR, esclerose múltipla surto-remissão; EMSP, esclerose múltipla secundária progressiva; EM, esclerose múltipla; EDSS, *expanded disability status scale*

Outro aspeto importante é saber se o AHSCT pode oferecer benefícios para as formas progressivas de EM, que podem continuar a ter elementos de neuroinflamação resistente e contínua. Nas últimas duas décadas, um grande número de doentes com doença progressiva foi tratado com AHSCT e há algumas evidências de taxas reduzidas de surtos e estabilização clínica, mas é difícil interpretar esses estudos devido à ausência de grupos de controlo. (1,22–24) São necessários mais RCT para avaliar o benefício terapêutico de AHSCT em EMSP e EMPP com evidência de inflamação significativa.

CONCLUSÃO

O AHSCT tem evoluído consideravelmente como estratégia de tratamento, em paralelo com o crescente conhecimento da doença e a evolução do arsenal terapêutico.

Mais recentemente, foram alcançados excelentes resultados principalmente graças a uma crescente especialização dos centros de transplante, um aperfeiçoamento dos protocolos e a uma melhor seleção de doentes. O perfil do candidato "ideal" foi recentemente delineado e a "janela de oportunidade terapêutica" ideal situa-se nas fases iniciais da doença, quando a inflamação é predominante e o nível de incapacidade é baixo. Nesta fase, os prováveis benefícios da utilização de AHSCT num doente refratário a terapêuticas de elevada eficácia ultrapassam os riscos associados, e uma melhoria da incapacidade é relatada numa proporção considerável de doentes. Em contrapartida, a relação benefício/risco do transplante é desfavorável em fases avançadas, onde os riscos peri-processuais são elevados e os benefícios esperados são reduzido. A zona entre as duas situações opostas representa uma zona cinzenta onde é essencial uma avaliação mais rigorosa de cada caso individualmente.

Embora se espere uma evidência definitiva através dos atuais RCT, o transplante foi recentemente aprovado como "padrão de cuidados, evidência clínica disponível" pela Sociedade Americana de Transplante de Sangue e Medula bem como ao abrigo das diretrizes da EBMT e pode ser oferecido a doentes cuidadosamente selecionados por centros de tratamento multidisciplinares experientes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas orientadoras, Professora Doutora Isabel Santana e Doutora Inês Correia, pelo inestimável apoio, orientação e disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e preocupações ao longo da elaboração deste trabalho.

Por fim, agradeço à minha família, pelo exemplo de trabalho e resiliência, e por incansavelmente me acompanharem em todos os momentos.

REFERÊNCIAS

1. Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. Vol. 13, *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 391–405.
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020 Dec 1;26(14):1816–21.
3. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. Vol. 26, *European Journal of Neurology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 27–40.
4. Merkel B, Butzkueven H, Traboulsee AL, Havrdova E, Kalincik T. Timing of high-efficacy therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis: A systematic review. Vol. 16, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2017. p. 658–65.
5. Sormani MP, Muraro PA, Schiavetti I, Signori A, Laroni A, Saccardi R, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis A meta-analysis. *Neurology*. 2017 May 30;88(22):2115-2122.
6. Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, Chitnis T, Weiner HL. Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort. *JAMA Neurology*. 2015 Feb 1;72(2):152–8.
7. Sharrack B, Saccardi R, Alexander T, Badoglio M, Burman J, Farge D, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation and other cellular therapy in multiple sclerosis and immune-mediated neurological diseases: updated guidelines and recommendations from the EBMT Autoimmune Diseases Working Party (ADWP) and the Joint Accreditation Committee of EBMT and ISCT (JACIE). *Bone Marrow Transplantation*. 2020 Feb 1;55(2):283–306.
8. Burt RK, Traynor AE, Cohen B, Karlin KH, Davis FA, Stefoski D, et al. T cell-depleted autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: report on the first three patients. Vol. 21, *Bone Marrow Transplantation*. 1998 Mar; 21(6):537-411.
9. Cooley HM, Snowden JA, Grigg AP, Wicks IP. Outcome of rheumatoid arthritis and psoriasis following autologous stem cell transplantation for hematologic malignancy. 1997 Sep;40(9):1712-5.
10. Binks M, Passweg JR, Furst D, Mcsweeney P, Sullivan K, Besenthal C, et al. Phase I/II trial of autologous stem cell transplantation in systemic sclerosis: procedure related mortality and impact on skin disease [Internet]. Available from: <http://ard.bmj.com/>
11. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple

- sclerosis: first results of a pilot study. Vol. 20, Bone Marrow Transplantation. 1997 Oct;20(8):631-8.
12. Marmont AM, van Lint MT, Gualandi F, Bacigalupo A. Case Report Autologous marrow stem cell transplantation for severe systemic lupus erythematosus of long duration. *Lupus*. 1997;6(6):545-8.
 13. van Bekkum DW. Preclinical experiments. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2004;17(2):201–22.
 14. Burt RK, Burns W, Ruvolo P, Fischer A, Shiao C, Guimaraes A, et al. Spinal Cord of Lewis Rats With Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research*. 1995 Jul 1;41(4):526-31.
 15. Atkins HL, Bowman M, Allan D, Anstee G, Arnold DL, Bar-Or A, et al. Immunoablation and autologous haemopoietic stem-cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a multicentre single-group phase 2 trial. *The Lancet*. 2016 Aug 6;388(10044):576–85.
 16. Burt RK, Balabanov R, Burman J, Sharrack B, Snowden JA, Oliveira MC, et al. Effect of Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation vs Continued Disease-Modifying Therapy on Disease Progression in Patients with Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2019 Jan 15;321(2):165–74.
 17. Nash RA, Hutton GJ, Racke MK, Popat U, Devine SM, Steinmiller KC, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS [Internet]. 2017. Available from: https://www.itntrialshare.org/HALTMS_5yr.url
 18. Mancardi GL, Sormani MP, di Gioia M, Vuolo L, Gualandi F, Amato MP, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation with an intermediate intensity conditioning regimen in multiple sclerosis: The Italian multi-centre experience. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012 Jun 1;18(6):835–42.
 19. Burman J, Iacobaeus E, Svenningsson A, Lycke J, Gunnarsson M, Nilsson P, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: The Swedish experience. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2014;85(10):1116–21.
 20. Curro D, Vuolo L, Gualandi F, Bacigalupo A, Roccatagliata L, Capello E, et al. Low intensity lympho-ablative regimen followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in severe forms of multiple sclerosis: A MRI-based clinical study. *Multiple Sclerosis*. 2015 Oct 1;21(11):1423–30.
 21. Chen B, Zhou M, Ouyang J, Zhou R, Xu J, Zhang Q, et al. Long-term efficacy of autologous haematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis at a single institution in China. *Neurological Sciences*. 2012 Aug;33(4):881–6.

22. Muraro PA, Pasquini M, Atkins HL, Bowen JD, Farge D, Fassas A, et al. Long-term outcomes after autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *JAMA Neurology*. 2017 Apr 1;74(4):459–69.
23. Shevchenko JL, Kuznetsov AN, Ionova TI, Melnichenko VY, Fedorenko DA, Kurbatova KA, et al. Long-term outcomes of autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis: physician's and patient's perspectives. *Annals of Hematology*. 2015 Jul 18;94(7):1149–57.
24. Mancardi GL, Sormani MP, Gualandi F, Saiz A, Carreras E, Merelli E, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis A phase II trial. 2015 Mar 10;84(10):981-8.
25. Moore JJ, Massey JC, Ford CD, Khoo ML, Zaunders JJ, Hendrawan K, et al. Prospective phase II clinical trial of autologous haematopoietic stem cell transplant for treatment refractory multiple sclerosis. Vol. 90, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. BMJ Publishing Group; 2019. p. 514–21.
26. Snowden JA, McGrath E, Duarte RF, Saccardi R, Orchard K, Worel N, et al. JACIE accreditation for blood and marrow transplantation: Past, present and future directions of an international model for healthcare quality improvement. *Bone Marrow Transplantation*. 2017 Oct 1;52(10):1367–71.
27. Saccardi R, Gualandi F. Hematopoietic stem cell transplantation procedures. *Autoimmunity*. 2008;41(8):570–6.
28. Snowden JA, Saccardi R, Allez M, Ardizzone S, Arnold R, Cervera R, et al. Haematopoietic SCT in severe autoimmune diseases: Updated guidelines of the European group for blood and marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2012 Jun;47(6):770–90.
29. Mariottini A, Innocenti C, Forci B, Magnani E, Mechi C, Barilaro A, et al. Safety and efficacy of autologous hematopoietic stem-cell transplantation following natalizumab discontinuation in aggressive multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2019 Apr 1;26(4):624–30.
30. Atkins HL, Freedman MS. Hematopoietic Stem Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Top 10 Lessons Learned. Vol. 10, *Neurotherapeutics*. Springer Science and Business Media, LLC; 2013. p. 68–76.
31. Das J, Snowden JA, Burman J, Freedman MS, Atkins H, Bowman M, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation as a first-line disease-modifying therapy in patients with 'aggressive' multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2021 Jul 1;27(8):1198–204.
32. Saccardi R, Kozak T, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, Kazis A, Havrdova E, et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: Update of the

- European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Multiple Sclerosis*. 2006 Dec;12(6):814–23.
33. Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood*. 2003 Oct 1;102(7):2364–72.
 34. Samijn JPA, te Boekhorst PAW, Mondria T, van Doorn PA, Flach HZ, van der Meché FGA, et al. Intense T cell depletion followed by autologous bone marrow transplantation for severe multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2006 Jan;77(1):46–50.
 35. Hamerschlak N, Rodrigues M, Moraes DA, Oliveira MC, Stracieri ABPL, Pieroni F, et al. Brazilian experience with two conditioning regimens in patients with multiple sclerosis: BEAM/horse ATG and CY/rabbit ATG. *Bone Marrow Transplantation*. 2010 Feb;45(2):239–48.
 36. Snowden JA, Badoglio M, Labopin M, Giebel S, McGrath E, Marjanovic Z, et al. Evolution, trends, outcomes, and economics of hematopoietic stem cell transplantation in severe autoimmune diseases. *Blood Advances*. 2017 Dec 26;1(27):2742–55.
 37. Mehra V, Rhone E, Widya S, Zuckerman M, Potter V, Raj K, et al. Epstein-Barr Virus and Monoclonal Gammopathy of Clinical Significance in Autologous Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis. *Clinical Infectious Diseases*. 2019 Nov 15;69(10):1757–63.
 38. Alexander T, Bondanza A, Muraro PA, Greco R, Saccardi R, Daikeler T, et al. SCT for severe autoimmune diseases: Consensus guidelines of the European Society for Blood and Marrow Transplantation for immune monitoring and biobanking. *Bone Marrow Transplantation*. 2015 Feb 7;50(2):173–80.
 39. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Guenaga FJ, Cassiani-Ingoni R, et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *Journal of Experimental Medicine*. 2005 Mar 7;201(5):805–16.
 40. Abrahamsson S, Muraro PA. Immune re-education following autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Autoimmunity*. 2008;41(8):577–84.
 41. Karnell FG, Lin D, Motley S, Duhon T, Lim N, Campbell DJ, et al. Reconstitution of immune cell populations in multiple sclerosis patients after autologous stem cell transplantation. Vol. 189, *Clinical and Experimental Immunology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 268–78.
 42. Abrahamsson S v., Angelini DF, Dubinsky AN, Morel E, Oh U, Jones JL, et al. Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory

- cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain*. 2013;136(9):2888–903.
43. Sousa A de PA, Malmegrim KCR, Panepucci RA, Brum DS, Barreira AA, dos Santos AC, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation reduces abnormalities in the expression of immune genes in multiple sclerosis. *Clinical Science*. 2015;128(2):111–20.
 44. Arruda LCM, Lorenzi JCC, Sousa APA, Zanette DL, Palma PVB, Panepucci RA, et al. Autologous hematopoietic SCT normalizes miR-16, -155 and -142-3p expression in multiple sclerosis patients. *Bone Marrow Transplantation*. 2015 Mar 1;50(3):380–9.
 45. Massey JC, Sutton IJ, Ma DDF, Moore JJ. Regenerating immunotolerance in multiple sclerosis with autologous hematopoietic stem cell transplant. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2018.
 46. Muraro PA, Robins H, Malhotra S, Howell M, Phippard D, Desmarais C, et al. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *Journal of Clinical Investigation*. 2014 Mar 3;124(3):1168–72.
 47. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Vol. 15, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 545–58.
 48. Darlington PJ, Touil T, Doucet JS, Gaucher D, Zeidan J, Gauchat D, et al. Diminished Th17 (not Th1) responses underlie multiple sclerosis disease abrogation after hematopoietic stem cell transplantation. *Annals of Neurology*. 2013 Mar;73(3):341–54.
 49. Sun W, Popat U, Hutton G, Zang YCQ, Krance R, Carrum G, et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. Vol. 127, *Brain*. 2004. p. 996–1008.
 50. Burt RK, Padilla J, Begolka WS, Dal Canto MC, Miller SD. Effect of Disease Stage on Clinical Outcome After Syngeneic Bone Marrow Transplantation for Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2609–16.
 51. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4⁺ CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology*. 2008;123(1):79–89.
 52. Burman J, Fransson M, Tötterman TH, Fagius J, Mangsbo SM, Loskog ASI. T-cell responses after haematopoietic stem cell transplantation for aggressive relapsing-remitting multiple sclerosis. *Immunology*. 2013 Oct;140(2):211–9.
 53. Arruda LCM, de Azevedo JTC, de Oliveira GLV, Scortegagna GT, Rodrigues ES, Palma PVB, et al. Immunological correlates of favorable long-term clinical outcome in multiple

- sclerosis patients after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Immunology*. 2016 Aug 1;169:47–57.
54. Autran B, Leblond V, Sadat-Sowti B, Lefranc E, Got P, Sutton L, et al. A Soluble Factor Released by CDSfCD57+ Lymphocytes From Bone Marrow Transplanted Patients Inhibits Cell-Mediated Cytolysis. *Blood*. 1991 May 15;77(10):2237-41.
 55. Mollet L, Sadat-Sowti B, Rg Duntze J, Leblond V, Bergeron F, Calvez V, et al. CD8 hi CD57 T lymphocytes are enriched in antigen-specific T cells capable of down-modulating cytotoxic activity. Vol. 10, *International Immunology*. 1998 Mar;10(3):311-23.
 56. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2009;66(3):390–402.
 57. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*. 2009;10(5):514–23.
 58. Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, et al. CD161highCD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*. 2011 Feb;134(2):542–54.
 59. Baltimore D, Boldin MP, O'Connell RM, Rao DS, Taganov KD. MicroRNAs: New regulators of immune cell development and function. Vol. 9, *Nature Immunology*. 2008. p. 839–45.
 60. Paraboschi EM, Soldà G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD, et al. Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011 Dec;12(12):8695–712.
 61. Murugaiyan G, Beynon V, Mittal A, Joller N, Weiner HL. Silencing MicroRNA-155 Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. 2011 Sep 1;187(5):2213–21.
 62. Waschbisch A, Atiya M, Linker RA, Potapov S, Schwab S, Derfuss T. Glatiramer acetate treatment normalizes deregulated microRNA expression in relapsing remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE*. 2011 Sep 16;6(9).
 63. Keller A, Leidinger P, Steinmeyer F, Stähler C, Franke A, Hemmrich-Stanisak G, et al. Comprehensive analysis of microRNA profiles in multiple sclerosis including next-generation sequencing. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014;20(3):295–303.
 64. Feng X, Petraglia AL, Chen M, Byskosh P v, Boos MD, Reder AT. Low expression of interferon-stimulated genes in active multiple sclerosis is linked to subnormal phosphorylation of STAT1 [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/jneuroim

65. Huang B, Zhao J, Lei Z, Shen S, Li D, Shen GX, et al. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Reports*. 2009;10(2):180–5.
66. Liu X, Robinson SN, Setoyama T, Tung SS, D'Abundo L, Shah MY, et al. FOXP3 is a direct target of miR15a/16 in umbilical cord blood regulatory T cells. *Bone Marrow Transplantation*. 2014;49(6):793–9.
67. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation [Internet]. Vol. 192, *J. Exp. Med.* 2000. Available from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/192/7/1027>
68. Trabattoni D, Saresella M, Pavecchi M, Marventano I, Mendozzi L, Rovaris M, et al. Costimulatory Pathways in Multiple Sclerosis: Distinctive Expression of PD-1 and PD-L1 in Patients with Different Patterns of Disease. *The Journal of Immunology*. 2009 Oct 15;183(8):4984–93.
69. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 Dec 21;206(13):3015–29.
70. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Vol. 8, *Nature Immunology*. 2007. p. 239–45.
71. Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, Cui J, Pelker JW, Jussif J, et al. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*. 2007 Jan;182(1–2):124–34.
72. Zhu B, Guleria I, Khosroshahi A, Chitnis T, Imitola J, Azuma M, et al. Differential Role of Programmed Death-Ligand 1 and Programmed Death-Ligand 2 in Regulating the Susceptibility and Chronic Progression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 1. Vol. 176, *The Journal of Immunology*. 2006 Mar 15;176(6):3480-9.
73. Salama AD, Chitnis T, Imitola J, Akiba H, Tushima F, Azuma M, et al. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 Jul 7;198(1):71–8.
74. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, Rieckmann P, Toyka K v., Mäurer M, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*. 2005;58(1):50–7.
75. McKinney EF, Lee JC, Jayne DRW, Lyons PA, Smith KGC. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. *Nature*. 2015 Jul 30;523(7562):612–6.

76. Darlington PJ, Stopnicki B, Touil T, Doucet JS, Fawaz L, Roberts ME, et al. Natural killer cells regulate Th17 cells after autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsing remitting multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 2018 May 7;9:834.
77. Zhukovsky C, Sandgren S, Silfverberg T, Einarsdottir S, Tolf A, Landtblom AM, et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation compared with alemtuzumab for relapsing-remitting multiple sclerosis: An observational study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 2021 Feb 1;92(2):189–94.
78. Boffa G, Lapucci C, Sbragia E, Varaldo R, Raiola AM, Currò D, et al. Aggressive multiple sclerosis: a single-centre, real-world treatment experience with autologous haematopoietic stem cell transplantation and alemtuzumab. *European Journal of Neurology*. 2020 Oct 1;27(10):2047–55.
79. Mariottini A, Filippini S, Innocenti C, Forci B, Mechi C, Barilaro A, et al. Impact of autologous haematopoietic stem cell transplantation on disability and brain atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2021 Jan 1;27(1):61–70.
80. Nash RA, Hutton GJ, Racke MK, Popat U, Devine SM, Griffith LM, et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for relapsing-remitting multiple sclerosis (HALT-MS): A 3-year interim report. *JAMA Neurology*. 2015 Feb 1;72(2):159–69.
81. Casanova B, Jarque I, Gascón F, Hernández-Boluda JC, Pérez-Miralles F, de la Rubia J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in relapsing-remitting multiple sclerosis: comparison with secondary progressive multiple sclerosis. *Neurological Sciences*. 2017 Jul 1;38(7):1213–21.
82. Sormani MP, Muraro PA, Saccardi R, Mancardi G. NEDA status in highly active MS can be more easily obtained with autologous hematopoietic stem cell transplantation than other drugs. Vol. 23, *Multiple Sclerosis*. SAGE Publications Ltd; 2017. p. 201–4.
83. Mancardi GL, Saccardi ; R, Filippi ; M, Gualandi ; F, Murialdo ; A, Inglese ; M, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS and the Italian GITMO-NEURO Intergroup on Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis*. *Neurology*. 2001 Jul 10;57(1):62-8.
84. Bose G, Freedman MS. Recent advances and remaining questions of autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis. Vol. 421, *Journal of the Neurological Sciences*. Elsevier B.V.; 2021 Feb 15;421:117324.
85. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. Vol. 97, *Neuron*. Cell Press; 2018. p. 742–68.

86. Dwyer MG, Hagemeyer J, Bergsland N, Horakova D, Korn JR, Khan N, et al. Establishing pathological cut-offs for lateral ventricular volume expansion rates. *NeuroImage: Clinical*. 2018;18:494–501.
87. Lee H, Narayanan S, Brown RA, Chen JT, Atkins HL, Freedman MS, et al. Brain atrophy after bone marrow transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2017 Mar 1;23(3):420–31.
88. Larsson D, Åkerfeldt T, Carlson K, Burman J. Intrathecal immunoglobulins and neurofilament light after autologous haematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2020 Oct 1;26(11):1351–9.
89. Thebault S, Abdoli M, Fereshtehnejad SM, Tessier D, Tabard-Cossa V, Freedman MS. Serum neurofilament light chain predicts long term clinical outcomes in multiple sclerosis. *Scientific Reports*. 2020 Dec 1;10(1):10381.
90. Novakova L, Zetterberg H, Sundström P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017;89(22):2230–7.
91. Bridel C, van Wieringen WN, Zetterberg H, Tijms BM, Teunissen CE, Alvarez-Cermeño JC, et al. Diagnostic Value of Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein in Neurology: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurology*. 2019 Sep 1;76(9):1035–48.
92. Chitnis T, Gonzalez C, Healy BC, Saxena S, Rosso M, Barro C, et al. Neurofilament light chain serum levels correlate with 10-year MRI outcomes in multiple sclerosis. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2018 Dec 1;5(12):1478–91.
93. Cantó E, Barro C, Zhao C, Caillier SJ, Michalak Z, Bove R, et al. Association between Serum Neurofilament Light Chain Levels and Long-term Disease Course among Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 12 Years. *JAMA Neurology*. 2019 Nov 1;76(11):1359–66.
94. Thebault S, Tessier DR, Lee H, Bowman M, Bar-Or A, Arnold DL, et al. High serum neurofilament light chain normalizes after hematopoietic stem cell transplantation for MS. *Neurology: Neuroimmunology and NeuroInflammation*. 2019 Sep 1;6(5)e598.
95. Bose G, Atkins HL, Bowman M, Freedman MS. Autologous hematopoietic stem cell transplantation improves fatigue in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019 Nov 1;25(13):1764–72.
96. Giedraitiene N, Kizlaitiene R, Peceliunas V, Griskevicius L, Kaubrys G. Selective cognitive dysfunction and physical disability improvement after autologous hematopoietic stem cell transplantation in highly active multiple sclerosis. *Scientific Reports*. 2020 Dec 4;10(1):21286.

97. Cancer Institute N. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0 [Internet]. 2017. Available from: <https://www.meddra.org/>
98. Guida M, Castaldi MA, Rosamilio R, Giudice V, Orio F, Selleri C. Reproductive issues in patients undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: an update. *Journal of Ovarian Research*. 2016 Nov 1;9(1):1–8.
99. Snarski E, Snowden JA, Oliveira MC, Simoes B, Badoglio M, Carlson K, et al. Onset and outcome of pregnancy after autologous haematopoietic SCT (AHSCT) for autoimmune diseases: A retrospective study of the EBMT autoimmune diseases working party (ADWP). *Bone Marrow Transplantation*. 2015 Feb 7;50(2):216–20.
100. Massenkeil G, Alexander T, Rosen O, Dörken B, Burmester G, Radbruch A, et al. Long-term follow-up of fertility and pregnancy in autoimmune diseases after autologous haematopoietic stem cell transplantation. *Rheumatology International*. 2016 Nov 1;36(11):1563–8.
101. Ge F, Lin H, Li Z, Chang T. Efficacy and safety of autologous hematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurological Sciences*. 2019 Mar 1;40(3):479–87.
102. Ocrelizumab or Alemtuzumab Compared With Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Multiple Sclerosis - a Phase-2 Randomised Controlled Trial - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04971005?id=NCT04047628+OR+NCT04971005+OR+NCT05029206+OR+NCT03113162+OR+NCT03477500+OR+NCT00716066&draw=2&rank=2&load=cart>
103. RCT Comparing Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation Versus Alemtuzumab in MS - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03477500?id=NCT04047628+OR+NCT04674280+OR+NCT04971005+OR+NCT05029206+OR+NCT03113162+OR+NCT03477500+OR+NCT00716066&draw=2&rank=5&load=cart>
104. Best Available Therapy Versus Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant for Multiple Sclerosis (BEAT-MS) - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04047628?id=NCT04047628+OR+NCT04674280+OR+NCT04971005+OR+NCT05029206+OR+NCT03113162+OR+NCT03477500+OR+NCT00716066&draw=2&rank=4&load=cart>
105. Clinical Trials Register [Internet]. [cited 2022 Jan 16]. Available from: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2019-001549-42/GB>

106. Alix JJP, Blackburn DJ, Sokhi D, Craven I, Sharrack B, Snowden JA. Autologous hematopoietic stem cell transplantation following pulsed cyclophosphamide in a severely disabled patient with malignant multiple sclerosis. Vol. 260, *Journal of Neurology*. 2013. p. 914–6.
107. Mancardi GL, Murialdo A, Rossi P, Gualandi F, Martino G, Marmont A, et al. Autologous stem cell transplantation as rescue therapy in malignant forms of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2005 Jun;11(3):367–71.
108. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, et al. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *The Lancet*. 2018 Mar 31;391(10127):1263–73.
109. Cohen JA, Baldassari LE, Atkins HL, Bowen JD, Bredeson C, Carpenter PA, et al. Autologous Hematopoietic Cell Transplantation for Treatment-Refractory Relapsing Multiple Sclerosis: Position Statement from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. Vol. 25, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc.; 2019. p. 845–54.
110. Freedman MS, Devonshire V, Duquette P, Giacomini PS, Giuliani F, Levin MC, et al. Treatment Optimization in Multiple Sclerosis: Canadian MS Working Group Recommendations. Vol. 47, *Canadian Journal of Neurological Sciences*. Cambridge University Press; 2020. p. 437–55.
111. Miller AE, Chitnis T, Cohen BA, Costello K, Sicotte NL, Stacom R. Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplant in Multiple Sclerosis: Recommendations of the National Multiple Sclerosis Society. Vol. 78, *JAMA Neurology*. American Medical Association; 2021. p. 241–6.