



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

KLEITON DE BARROS BORGES

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 3 EM PACIENTES  
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Recife

2018

KLEITON DE BARROS BORGES

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 3 EM PACIENTES  
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de mestrado apresentada no programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre.

**Área de concentração:** Neurogenética

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Borges, Kleiton de Barros

Análise do perfil de expressão das sirtuinas 1 e 3 em pacientes com esclerose múltipla / Kleiton de Barros Borges - 2018.

50 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.  
Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndices.

1. Doenças autoimunes 2. Desmielinização 3. Esclerose múltipla  
I. Martins, Danyelly Brunaska Gondim (orient.) II. Título

616.834

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-221

KLEITON DE BARROS BORGES

**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS SIRTUINAS 1 E 3 EM PACIENTES  
COM ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação de mestrado apresentada no programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 15/10/18.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Luiz Alberto Reis Mattos Junior

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>º</sup>. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>º</sup>. Carlos Henrique Madeiros Castelletti

Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais, irmão e minha esposa que tanto acreditaram e confiaram em mim, estimulando-me sempre a ser alguém melhor, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, acima de tudo, pela força depositada para que se mantenha firme na caminhada.

Aos pacientes, que tanto me ensinaram, sempre me lembrando do nosso propósito aqui na terra: ajudar as pessoas.

À minha família, por todo amor, carinho e paciência.

À mulher da minha vida, Sarah, por me ensinar diariamente o significado do verbo amar.

A meu amigo José Luiz Inojosa, colega de mestrado, pela amizade, pelos ensinamentos em neurologia e por me apresentar ao fascinante mundo da Neuroimunologia

À Patrícia e Amanda pelo trabalho maravilhoso na parte técnica do projeto

À família ProspecMol por todos esses anos de companheirismo, boas conversas e muita ciência.

À minha orientadora Dra. Danyelly Brunaska, por ter me apresentado aos caminhos da pesquisa, pela paciência, dedicação e pela amizade sincera desde os tempos de IC.

*“Estudar os fenômenos da doença sem livros é velejar em mares não mapeados, ao passo que estudar em livros sem pacientes é definitivamente nem ir para o mar”*

Sir William Osler

## RESUMO

Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória e crônica do Sistema Nervoso Central (SNC) atingindo mais de 2 milhões de pessoas no mundo, na sua maioria pacientes jovens e infelizmente ainda sem cura. Considerada uma desordem autoimune cuja susceptibilidade individual é governada por interface entre a genética individual e fatores ambientais (CROSS; PICCIO, 2014). A doença é marcada pelo padrão característico de acometimento neurológico em que os surtos ocorrem disseminados no tempo (em momentos diferentes) e espaço (vários locais de acometimento no SNC). Do ponto de vista fisiopatológico, muitos aspectos vêm sendo elucidados, com destaque para estresse oxidativo. No entanto, existem lacunas a serem respondidas para um melhor entendimento da doença. Sirtuínas 1 (SIRT1) e 3 (SIRT3) vêm como moléculas candidatas para esta tarefa devido suas conhecidas funções como agentes reguladores de resposta a estresse oxidativo. No presente estudo, analisamos os perfis de expressão dos genes das SIRT1 e SIRT3 em 14 pacientes com esclerose múltipla, forma surto-remissão, oriundos do ambulatório de doenças desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e correlacionamos com escala de incapacidade aferida pela Expanded Disability Status Scale (EDSS), idade, sexo, tipo de surto inicial e terapia medicamentosa. Utilizou-se PCR quantitativa em tempo real com análise das amostras em duplicata. Foi observada diminuição da expressão de RNA mensageiro dos genes SIRT1 e SIRT3 em relação aos parâmetros acima. Nossos dados sugerem que o perfil de expressão das Sirtuínas 1 e 3 em pacientes com EM forma surto-remissão pode ser útil no entendimento da patogênese desta condição além da possibilidade de apresentar-se como biomarcador para tal patologia auto-imune.

Palavras-chave: Esclerose múltipla. Sirtuina 1. Sirtuina 3.

## ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory and chronic disease of the Central Nervous System (CNS) reaching more than 2 million people worldwide, mostly young patients and unfortunately still no cure. Considered an autoimmune disorder whose individual susceptibility is governed by the interface between individual genetics and environmental factors (Cross and Piccio, 2014). The disease shows the characteristic pattern of neurological impairment in which relapses occur at different times and in various sites through CNS. From the pathophysiological view, many aspects have been elucidated, with emphasis on oxidative stress. However, there are gaps to be answered for a better understanding of the disease. Sirtuins 1 (SIRT1) and 3 (SIRT3) come as candidate molecules for this task due to their known functions as oxidative stress response regulators. In the present study, we analyzed the expression profiles of the SIRT1 and SIRT3 genes in 14 patients with relapsing-remitting sclerosis multiple sclerosis, from the outpatient clinic of demyelinating diseases of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco and correlated with the scale of disability assessed by Expanded Disability Status Scale (EDSS), age, sex, type of initial relapse, and drug therapy. Real-Time PCR was performed with analysis of duplicate samples. Decreased messenger RNA expression of SIRT1 and SIRT3 genes was observed with the above parameters. Our data suggest that the expression profile of Sirtuins 1 and 3 in patients with relapsing-remitting MS may be useful in understanding the pathogenesis of this condition in addition to being able to present itself as a biomarker for such autoimmune pathology.

Keywords: Multiple sclerosis. Sirtuin 1. Sirtuin 3.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 — Descrição da história natural da Esclerose múltipla quanto aos seus aspectos clínicos e radiográficos além das formas da doença bem como sumário da terapêutica (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018).....	14
Figura 2 — Lesões típicas de EM (dedos de Dawson) vista em RM de paciente participante da pesquisa (Autorizada divulgação de imagem).....	15
Figura 3 — Distribuição mundial da esclerose múltipla (Reproduzido de Atlas da EM 2013, Federação Internacional de Esclerose Múltipla) .....	19
Figura 4 — Modelo esquemático de reação enzimática realizada por sirtuinas em suas moléculas-alvo (KUPIS et al., 2016).....	23

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 — Critérios de Macdonald 2017 para o diagnóstico de EM.....	16
Tabela 2 — Perfil clínico dos pacientes com EM participantes da pesquisa .....	28

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 — Expressão gênica relativa de SIRT1 em relação a sexo nos pacientes com EM do estudo.....	29
Gráfico 2 — Expressão gênica relativa de SIRT1 em relação à faixa etária nos pacientes com EM do estudo .....	29
Gráfico 3 — Expressão gênica relativa de SIRT1 em relação à topografia do surto inicial nos pacientes com EM do estudo.....	30
Gráfico 4 — Expressão relativa de SIRT1 em relação a escala EDSS nos pacientes com EM do estudo.....	31
Gráfico 5 — Expressão relativa de SIRT1 em relação à presença de terapia medicamentosa nos pacientes com EM do estudo .....	32
Gráfico 6 — Expressão relativa de SIRT3 em relação a sexo nos pacientes com EM do estudo. ....	33
Gráfico 7 — Expressão relativa de SIRT3 em relação à faixa etária nos pacientes com EM do estudo.....	33
Gráfico 8 — Expressão relativa de SIRT3 em relação à topografia do surto inicial nos pacientes com EM do estudo .....	34
Gráfico 9 — Expressão relativa de SIRT3 em relação a escala EDSS nos pacientes com EM do estudo.....	35
Gráfico 10 — Expressão relativa de SIRT3 em relação à presença de terapia medicamentosa nos pacientes com EM do estudo .....	36

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1	ESCLEROSE MÚLTIPLA.....	13
1.1.1	<b>Fatores de risco.....</b>	<b>17</b>
1.1.2	<b>Fatores Genéticos.....</b>	<b>18</b>
1.1.3	<b>Fatores ambientais.....</b>	<b>18</b>
1.1.4	<b>Fisiopatologia da Esclerose Múltipla.....</b>	<b>20</b>
1.1.4.1	Células T autoreativas.....	20
1.1.4.2	Células B autoreativas.....	21
1.1.4.3	Células Regulatórias defectivas.....	22
1.2	PAPEL DAS SIRTUINAS.....	22
1.2.1	<b>Sirtuina 1.....</b>	<b>24</b>
1.2.2	<b>Sirtuina 3.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>26</b>
2.1	AMOSTRAS DOS PACIENTES.....	26
2.2	EXTRAÇÃO DE RNA E CONFECÇÃO DE cDNA.....	26
2.3	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL.....	26
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
3.1	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA SIRTUINA 1.....	28
3.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA SIRTUINA 3.....	32
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
	<b>APÊNDICE A - ESCALA DE INCAPACIDADE FUNCIONAL EXPANDIDA</b>	<b>44</b>
	<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>45</b>
	<b>APÊNDICE C - PARECER CONSUBSTANCIADO.....</b>	<b>49</b>

# 1 INTRODUÇÃO

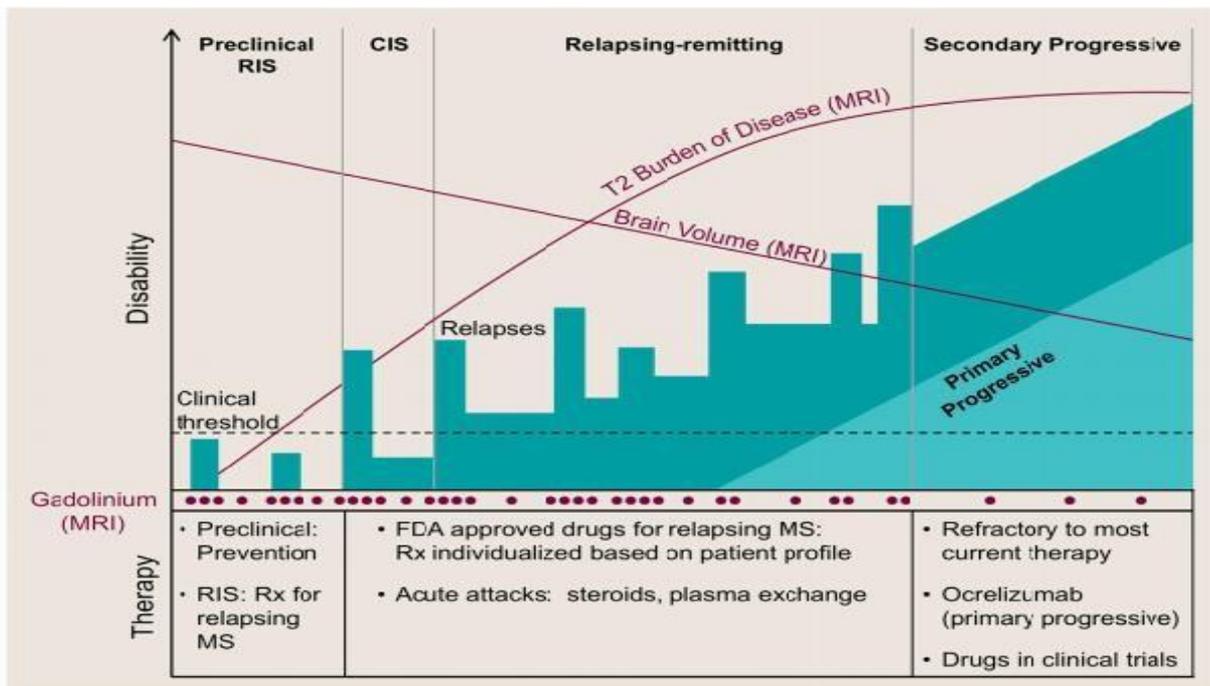
## 1.1 ESCLEROSE MÚLTIPLA

Esclerose múltipla é a mais comum doença desmielinizante inflamatória autoimune no sistema nervoso central, atingindo mais de 2 milhões de pessoas no mundo, infelizmente ainda sem cura (FEIGIN et al., 2017). Dados brasileiros demonstraram uma taxa de prevalência de aproximadamente 15 casos por 100.000 habitantes (CALLEGARO et al., 2001) (FRAGOSO; PERES, 2007). Afeta, predominantemente, pacientes jovens e é mais comum em mulheres que homens, com considerável impacto funcional, financeiro e na qualidade de vida destes indivíduos. Despesas são bastante elevadas e aumentam consideravelmente conforme maior incapacidade presente. Tais gastos comprometem orçamento do estado, convênios de saúde particulares e pacientes, tendo a busca do diagnóstico e tratamento precoce como alvos das principais pesquisas atualmente (DA SILVA et al., 2016) (THOMPSON et al., 2018a).

A presença de episódios de disfunção neurológica inteiramente ou parcialmente reversíveis com duração de dias a semanas é uma característica da doença. O tipo de acometimento depende da topografia afetada e apesar da possibilidade de múltiplos sintomas os mais comuns são: fraqueza em membros, déficits sensitivos, baixa da acuidade visual monocular devido a neurite óptica ou ataxia por lesão cerebelar (BROWNLEE et al., 2017).

A doença pode ser encontrada sob a forma de estágios evolutivos (Figura 1) que compreendem: um estágio pré-clínico detectável apenas por ressonância magnética (RM), uma forma surto-remissão, compreendendo episódios de déficits neurológicos seguidos de resolução que ao longo de anos pode evoluir para uma fase de piora progressiva de incapacidades ao exame clínico, associada principalmente a perda de volume cerebral, sem apresentar surtos agudos ao que chamamos de forma secundariamente progressiva. Importante salientar que existe a forma primariamente progressiva, afetando até 15% dos pacientes logo no início da doença (BROWNLEE et al., 2017).

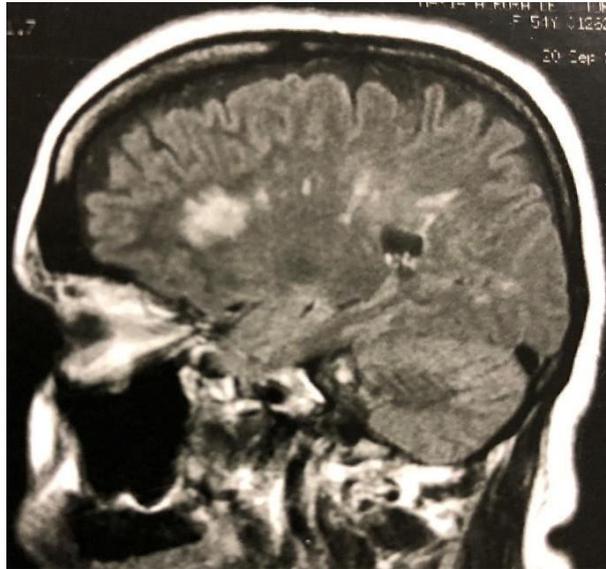
**Figura 1.** Descrição da história natural da Esclerose múltipla quanto aos seus aspectos clínicos e radiográficos além das formas da doença bem como sumario da terapêutica (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018).



A esclerose múltipla é diagnosticada quando os episódios de disfunção neurológica são disseminados no tempo e espaço e outra enfermidade que possa explicar ou mimetizar os sintomas seja excluída através de exames laboratoriais, eletrofisiológicos e por estudos de imagem. A falta de um marcador biológico específico ou mesmo um conjunto de marcadores reforça essa recomendação (COMABELLA; MONTALBAN, 2014).

RM apresenta um papel fundamental, ao contribuir com a identificação de lesões típicas da patologia as quais apresentam geralmente formato ovalado com bordos finos e hipersinal nas sequencias T2 e FLAIR, predomínio em áreas justacorticais e periventriculares, podendo afetar também segmentos infratentoriais e medulares com aspecto de dedos de luva (“dedos de Dawson”) (Figura 2) (ALIAGA; BARKHOF, 2014).

**Figura 2.** Lesões típicas de EM (dedos de Dawson) vista em RM de paciente participante da pesquisa (Autorizada divulgação de imagem).



As lesões quando em atividade apresentam captação pelo contraste. Além disso, RM também ajuda na exclusão de condições que mimetizam esclerose múltipla como por exemplo: deficiência de vitamina B12, vasculites em SNC, Lupus eritematoso sistêmico (LES), sarcoidose, infecção no SNC pelo HIV. Utilizam-se os critérios de Macdonald, revisados em 2017, para o diagnóstico de EM (Tabela 1) (THOMPSON et al., 2018b). Entretanto, tais critérios devem ser aplicados em pacientes com quadro clínico compatível com EM e a aplicação destes critérios diante de sintomas não sugestivos da doença em questão é um dos principais fatores para erro diagnóstico (SOLOMON et al., 2016).

Existe uma série de medicações modificadoras do curso da doença, direcionadas principalmente para os mecanismos auto-imunes, porém com pouco ou moderado efeito a nível de neurodegeneração. Se tais drogas são iniciadas precocemente, existe a possibilidade de redução dos surtos, menor incapacidade física e redução das lesões vistas por RM, um conceito intitulado como “No evidence of disease activity” (NEDA). Entretanto, apesar dos avanços no conhecimento fisiopatológico da doença, não se dispõe de um biomarcador com boa acurácia para identificação precoce de EM e para constatar falha terapêutica, bem como existem “lacunas a serem preenchidas quanto ao total entendimento da patogênese da EM (YADAV et al., 2015).

**Tabela 1.** Critérios de Macdonald 2017 para o diagnóstico de EM.

<b>Número de surtos clínicos</b>	<b>Número de lesões em RM com evidência clínica objetiva</b>	<b>Dados adicionais para o diagnóstico de EM</b>
2 ou mais	2 ou mais	Não
2 ou mais	1 (paciente deve ter uma clara evidência histórica de um surto envolvendo uma lesão de diferente localização anatômica)	Não
2 ou mais	1	Disseminação no espaço visualizada por um surto adicional de localização anatômica diferente ou por RM
1	2 ou mais	Disseminação no tempo demonstrada por um adicional surto clínico ou por RM ou por bandas oligoclonais (BOC) no liquor
1	1	Disseminação no espaço visualizada por um surto adicional de localização anatômica diferente ou por RM E disseminação no tempo demonstrada por um adicional surto clínico ou por RM ou por BOC no liquor

Acredita-se que estresse oxidativo contribui como um importante mecanismo patogênico em EM responsável pelo dano tecidual através de espécies reativas do oxigênio (do inglês ROS). Inclusive, observações em autopsias de pacientes com EM apontam estreito relacionamento entre desmielinização, neurodegeneração e lipídios oxidados nas camadas de mielina bem como em oligodendrócitos que sofreram apoptose (FISCHER et al., 2013). Neste contexto um importante grupo de moléculas pode acrescentar relevante informação para a fisiopatologia da EM: as sirtuínas. Tais moléculas desempenham papel de destaque quanto ao funcionamento normal celular e modulação de estresse oxidativo, estimulam atividade mitocondrial e ajudam a evitar perturbações na homeostase da célula decorrentes de diversas patologias (HOUTKOOPE; PIRINEN; AUWERX, 2016).

Não existem, até o momento, dados que analisem o perfil de expressão de sirtuínas 1 e 3, em pacientes com EM na população brasileira. Acredita-se que este estudo pode fornecer pistas para um melhor entendimento da fisiopatologia desta condição.

### **1.1.1 Fatores de risco**

É bastante improvável que a patogênese da esclerose múltipla seja atribuída a um único fator. Ao invés disso, acredita-se que ocorre interação entre fatores genéticos e ambientais explicando maior predisposição em desenvolver a doença. Existe muito debate acerca dos fenômenos iniciais que desencadeiam a doença são extrínsecos ou intrínsecos ao sistema nervoso central. Independentemente da teoria, estudos em modelos de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e humanos destacam o papel protagonista do sistema imune adaptativo na fisiopatogenia da esclerose múltipla (KIPP et al., 2012). Células T e B participam deste processo e são recrutados de forma seletiva por auto-antígenos presentes no sistema nervoso central, contribuindo para uma compartimentalização do processo inflamatório neste local. Postulou-se uma série de auto- antígenos como candidatos, entretanto, não existem estudos confirmando tal hipótese (HOHLFELD et al., 2016).

Em relação ao modelo intrínseco, acredita-se que o gatilho está situado no sistema nervoso central, acarretando uma importante liberação de antígenos para a periferia, sendo tais antígenos veiculados quer pelas células apresentadoras de antígenos quer por encaminhamento aos linfonodos. Este contexto adicionado de um ambiente pró-inflamatório, favoreceria desenvolvimento de resposta autoimune contra células do sistema nervoso central (HEMMER; KERSCHENSTEINER; KORN, 2015).

De forma contrária, também existe a hipótese do modelo extrínseco, o qual estabelece que o início do desencadeamento de resposta autoimune, inicia-se fora do sistema nervoso central com uma resposta imune aberrante. Conjectura-se, por exemplo, a participação de infecção sistêmica neste processo. Existem estudos que apontam a infecção em adultos jovens pelo vírus Epstein-Barr (EBV) como fator de risco para o desenvolvimento de esclerose múltipla (LEVIN et al., 2005). Entretanto, tem-se evidência conflituaosa na literatura se o vírus EBV está presente em pacientes com esclerose múltipla (SARGSYAN et al., 2010; LOSSIUS et al., 2014).

### 1.1.2 Fatores Genéticos

Esclerose múltipla não apresenta herança mendeliana, contudo apresenta um componente genético importante com uma taxa de concordância em gêmeos monozigóticos de cerca de 25%. Existem diferenças na prevalência da doença entre diversos grupos ancestrais. Condição rara em população negra africana, porém pode ser encontrada em afro-americanos (HOLLENBACH; OKSENBURG, 2015). Fatores genéticos explicam diferenças geográficas, mas não estabelecem as razões de pacientes com mesma descendência com diferenças quanto ao risco de desenvolver esclerose múltipla quando submetidas a áreas com diferente prevalência da doença.

Existe uma série de genes candidatos associados com esclerose múltipla, sendo a maioria deles relacionados a mecanismos imunológicos. Isso explica que mesmas variantes em regiões genômicas específicas podem associar-se com esclerose múltipla e outras patologias autoimunes (INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM (IMSGC), BEECHAM AH, PATSOPOULOS NA, XIFARA DK, DAVIS MF, KEMPPINEN A, COTSAPAS C, SHAH TS, SPENCER C, BOOTH D, GORIS A, OTURAI A, SAARELA J, FONTAINE B, HEMMER B, MARTIN C, ZIPP F, D'ALFONSO S, MARTINE, 2013).

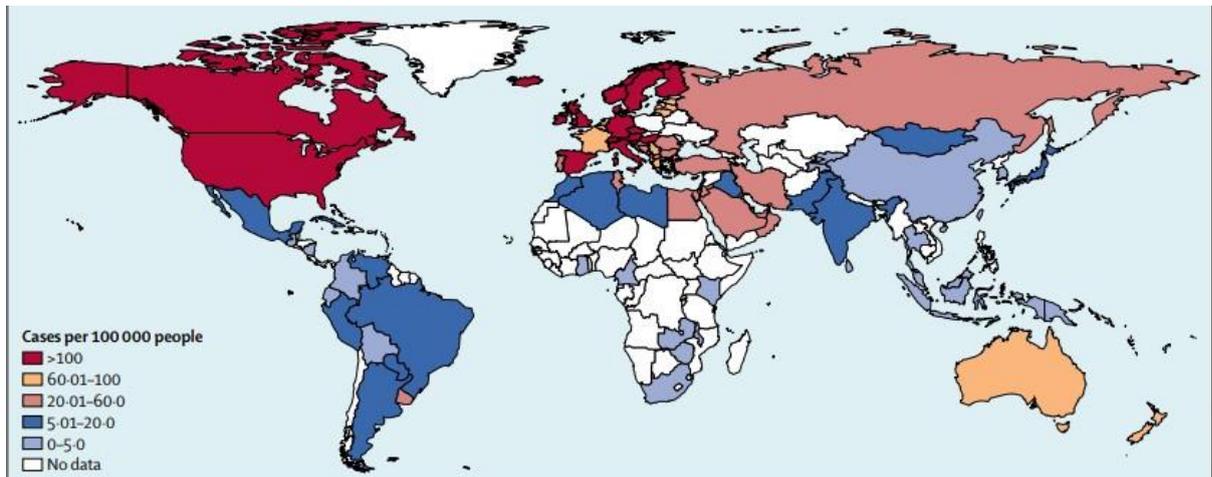
A região do antígeno leucocitário humano (HLA) no cromossomo 6 apresenta papel de destaque e tem sido relacionada a uma gama de doenças auto-imunes. Por exemplo, pacientes com a variante HLA DRB1\*15:01 apresentam risco 3 vezes maior de apresentar esclerose múltipla em relação a controles saudáveis (PATSOPOULOS et al., 2013). De uma forma geral, acredita-se que ocorre envolvimento de vias metabólicas relacionadas ao conceito de tolerância imunológica, bem como comprometimento da função de células T por anormal responsividade a citocinas, por exemplo. No entanto, apesar da importante contribuição dos estudos de associação em esclerose múltipla, investigação mais profunda faz-se necessária para fortalecer a relevância das variantes encontradas. Epigenômica e transcriptômica contribuem nessa tarefa (FARH et al., 2015; RAJ et al., 2016).

### 1.1.3 Fatores ambientais

Sabe-se que fatores ambientais interagem com genética determinando o curso da esclerose múltipla bem como suscetibilidade de desenvolver a doença. Estudos recentes evidenciaram, por exemplo, que existe um gradiente latitudinal da esclerose múltipla: maior prevalência da doença em áreas afastadas do Equador (SIMPSON et al., 2011). Adicionalmente, existem dados demonstrando que pacientes, antes da adolescência, que migraram de áreas de

baixo-risco para alto-risco de esclerose múltipla apresentam maior risco de desenvolver a doença. O oposto acarreta menor risco de esclerose múltipla (AHLGREN; ODÉN; LYCKE, 2012).

**Figura 3.** Distribuição mundial da esclerose múltipla (Reproduzido de Atlas da EM 2013, Federação Internacional de Esclerose Múltipla)



Deficiência de vitamina D, dieta, obesidade em faixa etária jovem e tabagismo são conhecidos como contribuintes para desenvolvimento de esclerose múltipla (MARRIE, 2004). Destes fatores, os mais importantes são tabagismo e deficiência de vitamina D. Esta apresenta diversas funções a nível de sistema imune, entre elas: bloqueio da proliferação de células B e T, estímulo a maior atividade de células T reguladoras (T regs) e fenótipo de maior tolerância imunológica por parte das células dendríticas (HARVEY; CANTORNA, 2013). Atualmente, configura-se prática aceita proceder reposição de vitamina D em todos os pacientes com esclerose múltipla (STEIN et al., 2011).

Fatores ambientais com maior probabilidade em desencadear resposta positiva de células T autoreativas costumam ser de etiologia infecciosa com seus efeitos provavelmente sendo explicados por mimetismo molecular (HARKIOLAKI et al., 2009). Neste contexto, como citado acima, infecção pelo vírus EBV apresenta-se como importante fator de risco. Postula-se que, em esclerose múltipla, ocorre desregulação de infecção latente deste vírus e isto promove maior atividade de células B em compartimento meníngeo e isto, em última instancia, poderia ativar células T autoreativas (LOSSIUS et al., 2014).

Recentemente, o microbioma intestinal tem sido tema de importante influencia em pacientes com esclerose múltipla. Sabe-se que microbioma apresenta contribuição em processos infecciosos, câncer, aterosclerose, doenças metabólicas e autoimunidade (LYNCH;

PEDERSEN, 2016). Seria possível então alguma relação entre perfil da microbiota e esclerose múltipla? Diversos estudos mostram possibilidade de comportamento dual. Como exemplo, Tregs podem ser ativadas no intestino por determinado grupo de comensais em modelos de EAE (ROUND; MAZMANIAN, 2010). De forma contrária, células T Helper 17 (Th17) intestinais foram correlacionadas com perturbações no microbioma e atividade da doença em esclerose múltipla (COSORICH et al., 2017). Independentemente do comportamento, microbioma parece estar relacionado à esclerose múltipla por promover um menor estado de tolerância imunológica além de atuar por meio de mimetismo molecular. Os estudos ainda não conseguem estabelecer causa-efeito, porém fornecem pistas importantes para elucidação da patogênese da doença.

#### **1.1.4 Fisiopatologia da Esclerose Múltipla**

Os inúmeros ensaios clínicos bem-sucedidos voltados para moléculas-alvo e específicos grupos celulares do sistema imune ratificam o notável papel do sistema imune adaptativo na fisiopatologia da esclerose múltipla. Células T presentes no sistema nervoso central conseguem ser detectadas precocemente no curso da doença e os estudos de associação de genes relacionados ao HLA e esclerose múltipla demonstram que provavelmente existem antígenos específicos no sistema nervoso central que são apresentados a células T autoreativas. Entretanto, até o momento, não se tem um antígeno estabelecido como potencial marcador para esclerose múltipla. Acredita-se que limitações técnicas na detecção são responsáveis por isso, bem como outros fatores como o fenômeno chamado “espalhamento de epítomos”, este define-se como uma resposta autoimune que pode englobar mais de um epítopo na mesma molécula bem como em moléculas vizinhas (JI; CASTELLI; GOVERMAN, 2013).

##### **1.1.4.1 Células T autoreativas**

De uma forma geral, a hipótese do modelo extrínseco é mais popular por sua maior reprodutibilidade clínica e experimental. Linfócitos T autoreativos são estimulados na periferia e se enquadram em um perfil eminentemente inflamatório. Tais células invadem o sistema nervoso central por quebra da barreira hematoencefálica e propiciam início do dano. Destas células T autoreativas, encontram-se células T CD4+ com predomínio dos subtipos Th1 e Th17 precocemente no curso da doença. Células Th1 promovem produção de interferon-gama e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), já células Th17 produzem as interleucinas 17, 21 e 22 bem como interferon-gama. Consequentemente ocorre ativação astrocitária e de macrófagos a nível

de SNC acarretando aumento da secreção de citocinas, potencialização da função das células apresentadoras de antígeno (APC) e produção de ROS promovendo estresse oxidativo importante. Estabelecer, farmacologicamente diferenciação para uma maior resposta Th2, desviando das respostas Th1 e Th17, é um dos mecanismos de ação de terapias modificadoras da doença de primeira linha como Interferon-beta (KOZOVSKA et al., 1999) e acetato de glatiramer (MILLER et al., 1998).

Embora muito esforço tenha sido voltado para o papel das células T CD4+ em esclerose múltipla, células T CD8 também apresenta papel de destaque em estudos com modelos de EAE bem como em pacientes. Tais células reconhecem e processam peptídeos de proteínas expressas pelas APCs por intermédio do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) tipo I. O ataque consiste de contato célula-célula com liberação de enzimas chamadas granzimas A e B (BARRY; BLEACKLEY, 2002). Importante salientar que pacientes com esclerose múltipla apresentam expressão aumentada de genes relacionados ao complexo MHC I e II (HILA; SOANE; KOSKI, 2001).

Células T CD8 altamente reativas à bainha de mielina dos neurônios são encontradas com frequência em pacientes com esclerose múltipla. Tais células secretam interferon-gama e IL-17 (HUBER; HEINK; PAGENSTECHE, 2013), promovem dano axonal por sua função citotóxica e, em modelo animal, promovem maior migração transendotelial a nível de barreira hemato-encefálica (LAROCHELLE et al., 2015). De forma contrária, existem subtipos de células T CD8, que expressam CD122 por exemplo, os quais apresentam funções supressoras do sistema imune com conseqüente potencial papel benéfico em pacientes com esclerose múltipla (LU et al., 2016).

#### 1.1.4.2 Células B autoreativas

Os efeitos animadores da terapia anti-CD20 (ocrelizumab) em pacientes com esclerose múltipla destacam a importância das células B na patogênese da doença, apesar de esclerose múltipla ser considerada um patologia de células T (GREENFIELD; HAUSER, 2017). Tais células podem ser encontradas no líquido cefalorraquidiano (LCR), meninges e córtex cerebral. Principalmente nas formas secundárias, podem formar agregados meníngeos linfoides junto com células T, plasmócitos e células dendríticas de forma análoga a doenças infecciosas ou condições inflamatórias crônicas. Formas progressivas primárias parecem manifestar comportamento diverso já que manifestam infiltrado meníngeo difuso sem estas estruturas linfoides terciárias (CHOI et al., 2012). As células B autoreativas além da capacidade de liberar

anticorpos, podem em esclerose múltipla possibilitar produção de citocinas e apresentação de antígenos para as células T. Confirmando este fato, tem-se um estudo que demonstrou a necessidade de células B para indução de doença em modelo de EAE em ratos com participação do MHC classe II (MOLNARFI et al., 2013).

Diante do exposto, acredita-se que os benefícios da terapia anti-CD20 fundamentam-se na capacidade de depleção de células B com perfil inflamatório, as quais poderiam recrutar células T para dano neuronal via apresentação de antígenos bem como produzir citocinas pró-inflamatórias.

#### 1.1.4.3 Células Regulatórias defectivas

Acredita-se que as células autoreativas acima em esclerose múltipla podem ter sua função facilitada por disfunção de células T regulatórias imunes. Entre elas tem-se Tregs, células regulatórias que expressam o fator de transcrição FoxP3. Bem como, células Tr1, as quais promovem produção de IL-10. Tais células são especialistas em supressão de outras células imunes, exercendo sua função por intermédio de contato célula-célula. Configuram aproximadamente 4% das células T CD4 circulantes (SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012) e apresentam receptores específicos para auto-antígenos (LEE et al., 2012).

Uma forte evidencia do papel das Tregs em pacientes com esclerose múltipla foi que a transferência destas células em ratos com EAE evitou o início e progressão de desmielinização (KOHM et al., 2002). Entretanto, ao se estudar Tregs FoxP3+ percebeu-se que seu número não difere entre indivíduos afetados e controles, ocorrendo na verdade um problema funcional destas células (falhas na maturação e migração destas) (ZOZULYA; WIENDL, 2008). Esta perda de funcionalidade parece prevalecer nos estágios iniciais da doença e não na fase crônica. Os dados vigentes ainda não são conclusivos para definir se comprometimento funcional das Tregs é a causa para esclerose múltipla desenvolver-se ou se isso é um fenômeno comum a todas patologias auto-imunes.

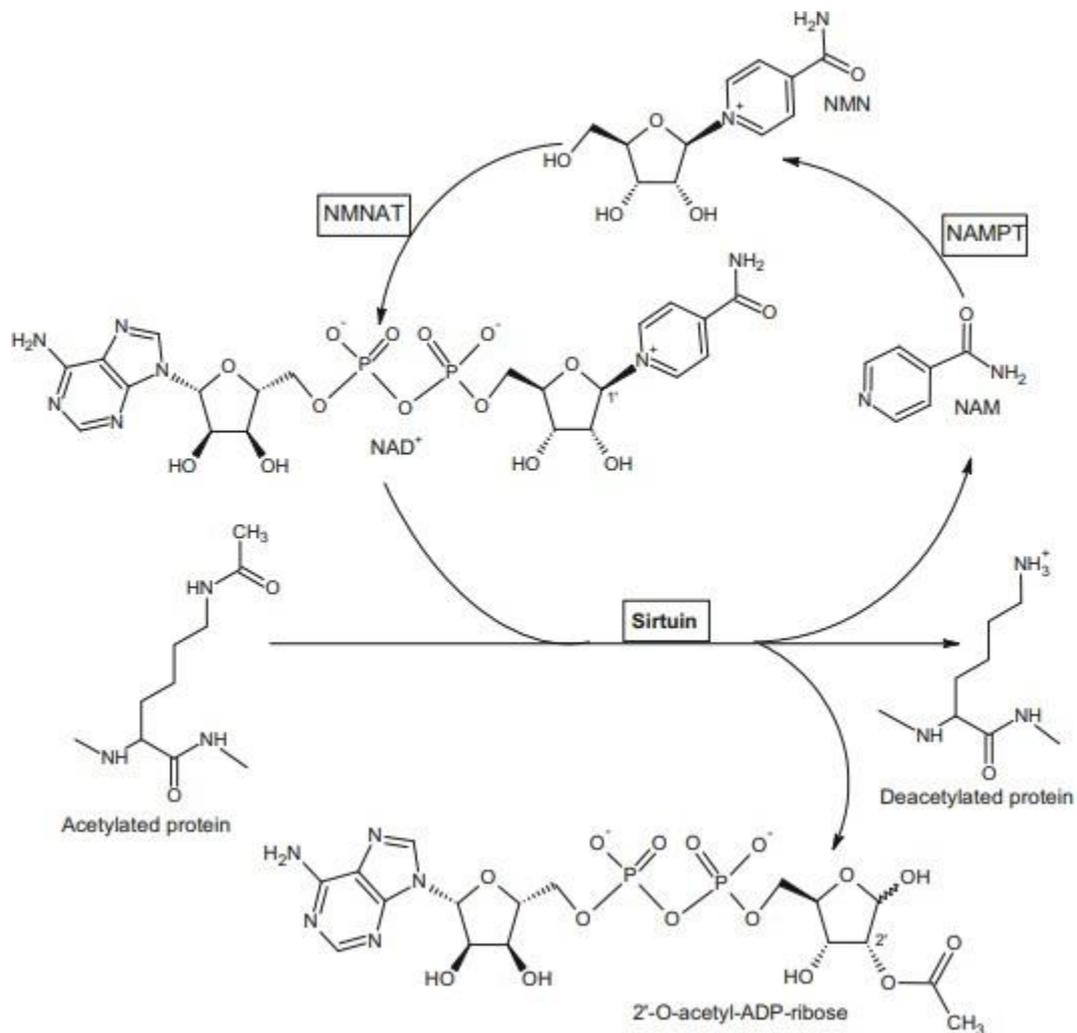
## 1.2 PAPEL DAS SIRTUINAS

Sabe-se que as terapias atuais para esclerose múltipla possibilitam redução dos surtos, no entanto, ainda não conseguem inibir a progressão da doença. Postula-se que o dano neuronal promovido pelo ataque imune possivelmente promove uma cascata de reações que culminam em um processo degenerativo (BARUCH et al., 2014). Tais reações compreendem, por

exemplo, estresse oxidativo, injúria mitocondrial e lesão neuronal por excitotoxicidade. Neste contexto, um importante grupo de moléculas surge como candidato para compreender o processo de neurodegeneração em esclerose múltipla bem como servir de alvo terapêutico: as sirtuínas.

Sirtuínas (SIRT) são um grupo de moléculas, altamente conservadas evolutivamente, caracterizadas como deacetilases (removem grupos acetil de resíduos de lisina em proteínas acetiladas) que dependem da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) em sua forma oxidada (CANTÓ; MENZIES; AUWERX, 2015). Até o momento, foram identificados 7 subtipos em mamíferos. As SIRTs, 1, 6 e 7 estão localizadas no núcleo, enquanto a SIRT2 tem localização citoplasmática, mas apresenta potencial de translocar-se para o núcleo. SIRTs 3, 4 e 5 localizam-se na mitocôndria (PARIHAR et al., 2015; (VAQUERO, 2009).

**Figura 4.** Modelo esquemático de reação enzimática realizada por sirtuínas em suas moléculas-alvo (KUPIS et al., 2016).



Tais moléculas, sensores metabólicos dos níveis de NAD<sup>+</sup>, desempenham papel de destaque na homeostase celular, estresse oxidativo, inflamação e envelhecimento. Acredita-se que maior atividade de sirtuínas pode ser um mecanismo protetor contra distúrbios metabólicos como também em processos neurodegenerativos (DONMEZ; OUTEIRO, 2013). Provavelmente, isto deve-se ao estímulo exercido pelas sirtuínas em relação à atividade mitocondrial. Tais compostos atuam monitorando a taxa de NAD<sup>+</sup>/Nicotinamida (NAM) e mudanças nos níveis de NAD<sup>+</sup> interferem com atividade das sirtuínas. Estas podem influenciar expressão genica ao perceber mudanças metabólicas que influenciam deacetilação de histonas a nível de cromatina (VAQUERO, 2009).

Observa-se que dano axonal em esclerose múltipla ocorre tanto na fase aguda como crônica da doença e um dos mecanismos implicados é a deficiência energética secundária a disfunção mitocondrial. Nesse contexto, sirtuínas, com destaque para as mitocondriais, tornam-se importantes alvos para melhor entendimento da fisiopatologia da doença. Existe estudo que aponta atividade de SIRT1 diminuída em pacientes com surtos de esclerose múltipla (TEGLA et al., 2014), no entanto, ainda não se tem nenhuma caracterização do perfil de expressão de SIRT3 em pacientes com essa patologia de etiologia auto-imune, porém com consequências metabólicas a nível mitocondrial.

### **1.2.1 Sirtuina 1**

Esta é a proteína mais bem caracterizada da família das sirtuínas. Estruturalmente, SIRT1 é uma deacetilase dependente de NAD que apresenta influência sobre homeostase celular, inflamação e estresse oxidativo (SANTOS; ESCANDE; DENICOLA, 2016). Tal molécula possui a capacidade de silenciamento da cromatina através da acetilação e/ou metilação de histonas. Em relação à EM, SIRT1 parece desempenhar comportamento dual. Existe estudo recente demonstrando que deficiência de SIRT1 promove menor produção de células Th17 com perfil pro-inflamatório, conseqüentemente, promovendo proteção contra doenças autoimunes mediadas por esse tipo celular (LIM et al., 2015).

De forma contrária, estudo com Resveratrol, um ativador de SIRT1, promoveu melhora clínica em modelos de EAE (FUENTES et al., 2016). (TEGLA et al., 2014) demonstrou uma menor expressão de RNAm em pacientes com EM. Devido a esse comportamento dual, é interessante prover estudos sobre perfil de expressão de RNAm da SIRT1 e outras Sirtuínas com mecanismos de ação plausíveis de aplicação em EM: Sirtuina 3 por exemplo. Além disso, não se dispõe de nenhum estudo em população brasileira que caracterize o perfil de expressão de

sirtuinas em pacientes com EM.

### 1.2.2 Sirtuina 3

SIRT3 é amplamente expressa em vários tipos celulares, principalmente naqueles com alta capacidade oxidativa, como as células do sistema nervoso central por exemplo (SIDOROVA-DARMOS et al., 2014). Tal molécula regula a atividade mitocondrial de forma positiva pela ativação de componentes da cadeia transportadora de elétrons dos complexos I e II bem como acetil-CoA-sintetases (SACK; FINKEL, 2012). Além disso, promove defesa contra ROS, diminuindo estresse oxidativo por intermédio de uma enzima mitocondrial antioxidante: superóxido dismutase tipo 2. Sirtuina 3 apresenta um mecanismo alternativo, observado em estudo com micróglia de camundongos, que consiste de regulação de ROS por estímulo à produção de enzimas antioxidantes via fator de transcrição de Forkhead box O 3a (Foxo3a) (RANGARAJAN et al., 2015).

Outro estudo estabeleceu a ligação entre privação de sono, estresse oxidativo aumentado, down-regulation de SIRT3 e estímulo à neurodegeneração (FIFEL, 2014). Em estudo com ratos, através de modelo de lesão neuronal induzido por AVC, inflamação e estresse oxidativo foram atenuados por maior atividade de sirtuina 3 promovida por um potente ativador desta molécula: adjudina (YANG et al., 2017). Não existem dados relacionados em humanos tampouco em pacientes com esclerose múltipla. Baseado nesse contexto, postula-se que possa haver também uma conexão entre esclerose múltipla, neurodegeneração promovida por ataque auto-imune e atividade de SIRT3 em cenário de injúria mitocondrial e estresse oxidativo.

Este trabalho teve como objetivo analisar o padrão de expressão dos genes das sirtuinas 1 e 3 em pacientes com esclerose múltipla de um hospital universitário visando determinar se estas moléculas contribuem para a fisiopatologia da doença. Buscou-se determinar se os níveis de expressão das sirtuinas 1 e 3 tem correlação com os aspectos clínicos da EM, na EM forma surto-remissão em comparação com controles saudáveis e se esses níveis são influenciados pela terapia medicamentosa prescrita.

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 AMOSTRAS DOS PACIENTES

Utilizaram-se 14 amostras de pacientes do ambulatório de doenças desmielinizantes do serviço de neurologia do Hospital das Clínicas da UFPE bem como 14 amostras de controles saudáveis. Todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido concordando com o estudo e em conformidade com aprovação do comitê de ética em pesquisa com seres humanos CEP/CCS/UFPE nº2.532.218. A média de idade foi de 34 anos consistindo de 35% do sexo masculino (n=5) e 65% do sexo feminino (n=9).

Como critérios de inclusão para os casos têm-se: preenchimento dos critérios de MacDonald revisados em 2017 para esclerose múltipla definida e curso surto-remissão, RM de encéfalo e/ou medular com achados de desmielinização em SNC. Como critérios de exclusão têm-se: histórico de outras doenças auto-imunes, doença vascular, etiologia infecciosa relacionada ao quadro clínico, uso de antibiótico nos últimos 30 dias, uso de drogas ou alcoolismo.

### 2.2 EXTRAÇÃO DE RNA E CONFECCÃO DE cDNA

Amostras sanguíneas de casos e controles foram coletadas, durante consulta ambulatorial, em veia periférica, sendo armazenadas em tubos liofilizados com EDTA mais 2 ml de RNA later, esta última substância necessária para adequada extração de RNA. Após transporte em gelo, as amostras foram armazenadas a -20°C e uma alíquota de 300 µl foi utilizada para extração de RNA, através do kit Maxwell 16 LEV simplyRNA Blood Kit (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA eluído foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Termo Fisher), e mantido a -80°C até o momento das análises.

A síntese de cDNA foi realizada pelo QuantiNova Reverse Transcription kit (Qiagen), seguindo as regras do fabricante. O cDNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Termo Fisher) e a concentração de uso para PCR em tempo real foi estabelecida em 100ng.

### 2.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

PCR quantitativa em tempo real foi realizada usando o sistema StepOne real-time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers para SIRT1 (Hs.PT.58.40790669) e SIRT3

(Hs.PT.58.22633153.g) foram obtidos da IDT (Coralville, IA), solubilizados em TE (Tris-EDTA, pH 8,0), de acordo com protocolo do fabricante. O gene da  $\beta$ -actina foi utilizado como referência para normalização dos níveis de expressão (Forward: 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'; Reverse: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'). A reação de qPCR foi realizada utilizando o GoTaq qPCR Master Mix (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata, e a água ultrapura foi utilizada como controle negativo da reação.

Para cada gene, os valores de cycle threshold (Ct) foram determinados na fase exponencial da amplificação e normalizados para expressão de  $\beta$ -actina, para obtenção dos valores de  $\Delta$ Ct. A análise dos níveis de expressão de SIRT1 e SIRT3 do grupo teste foi realizada em relação ao grupo de adultos saudáveis através do  $\Delta\Delta$ Ct. Os resultados foram expressos a partir dos resultados do cálculo do  $2^{-\Delta\Delta$ Ct}.

#### 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise dos dados foi construído um banco na planilha eletrônica Microsoft Excel e todas as análises realizadas através do GraphPad Prism 7.0a. Para comparar os percentuais encontrados nos níveis dos fatores avaliados, foi aplicado o teste Qui-quadrado para comparação de proporção, respeitando o nível de significância de 5%. Os valores de p foram considerados significantes apenas quando menores que 0,05.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nós procedemos um estudo para avaliar o perfil de expressão de RNA mensageiro das sirtuínas 1 e 3 em pacientes com esclerose múltipla forma surto- remissão.

As características clínicas dos pacientes estão discriminadas na Tabela 2. As análises levaram em consideração parâmetros como sexo, idade, valor de EDSS (0-3, 4 ou mais), topografia do surto inicial e presença de terapêutica medicamentosa. De uma forma geral, a maioria dos pacientes possui carga lesional baixa observada na RM e corroborada por valores baixos do EDSS. Nenhum paciente da pesquisa estava com surto em atividade.

**Tabela 2.** Perfil clínico dos pacientes com esclerose múltipla participantes da pesquisa.

Paciente	Sexo	Idade	EDSS	Surto inicial (topografia)	Terapia medicamentosa
1	F	57	6.5	Medular	Acetato de Glatirâmer
2	M	36	1.5	Medular	Fingolimode
3	M	25	6	Tronco/cortical	Não
4	M	35	1	Tronco/cortical	Acetato de Glatirâmer
5	F	45	3	Medular	Beta-interferona 1a
6	M	47	4	Medular	Acetato de Glatirâmer
7	F	27	1	Medular	Beta-interferona 1a
8	F	39	2	Tronco/cortical	Acetato de Glatirâmer
9	F	18	1.5	Tronco/cortical	Não
10	F	19	0	Nervo óptico	Não
11	F	19	4	Nervo óptico	Não
12	F	43	1	Tronco/cortical	Não
13	M	44	4	Tronco/cortical	Fingolimode
14	F	29	0	Medular	Teriflunomida

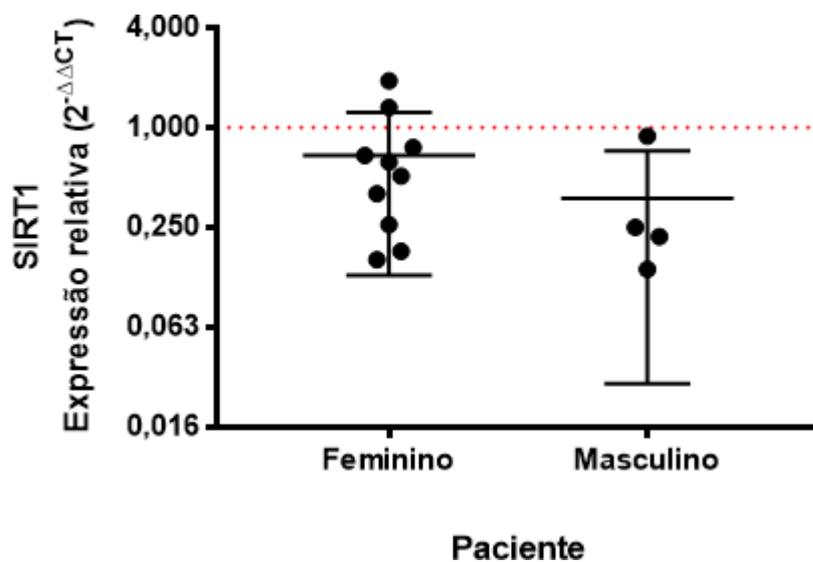
#### 3.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA SIRTUINA 1

Em relação a sexo, geralmente algumas doenças auto-imunes, como LES, tendem a ser

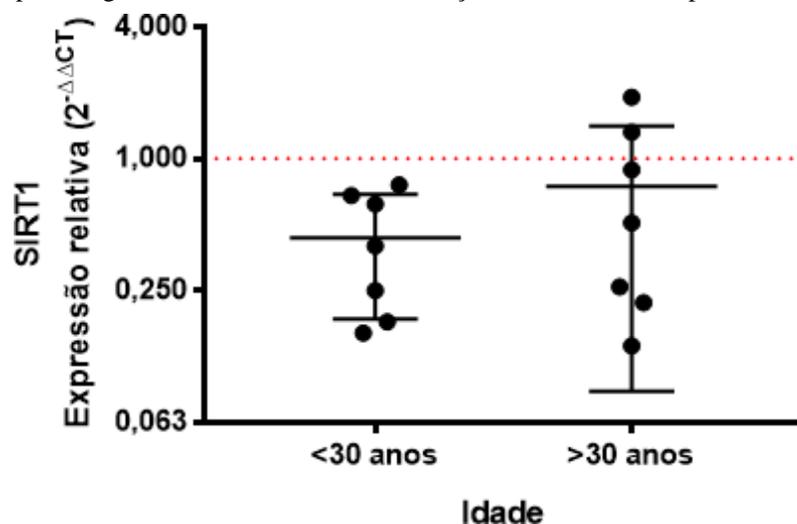
mais frequentes em pacientes do sexo feminino e com maior gravidade em pacientes do sexo masculino. Os mecanismos relacionados a isso são multifatoriais e pouco compreendidos. Avaliação do padrão de expressão demonstrou baixa expressão da SIRT1 em ambos os sexos quando comparada ao grupo controle (Gráfico 1).

Todos os pacientes com idade inferior aos 44 anos apresentaram expressão reduzida de SIRT1. Apenas os dois pacientes com idade de 45 e 57 anos apresentaram superexpressão deste gene. Não se têm, até o momento, estudos analisando especificamente perfil de expressão de RNAm de sirtuinas em relação a sexo e faixa etária (Gráfico 2) nos pacientes com EM bem como em pacientes em outras doenças desmielinizantes.

**Gráfico 1.** Expressão gênica relativa de SIRT1 em relação a sexo nos pacientes com EM do estudo.



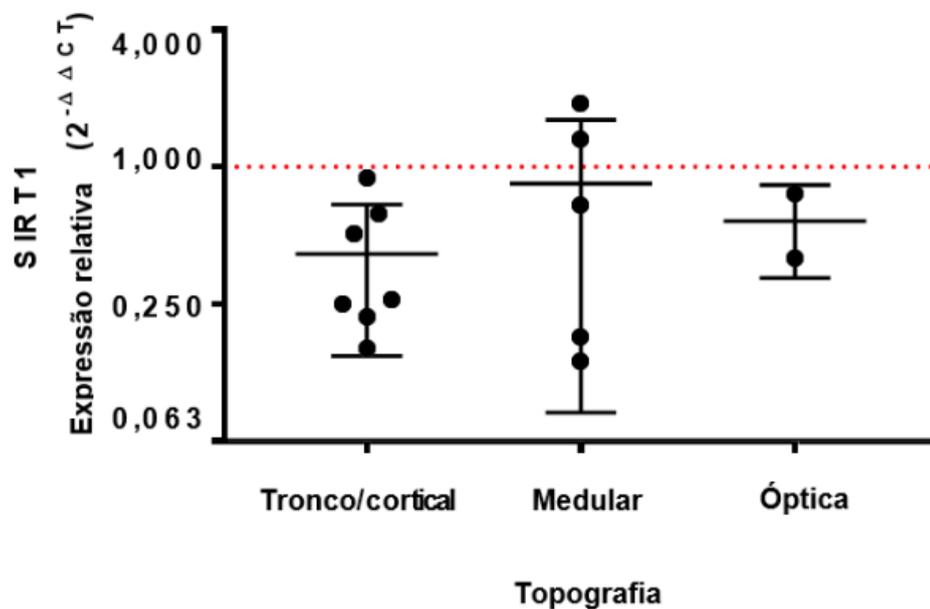
**Gráfico 2.** Expressão gênica relativa de SIRT1 em relação à faixa etária nos pacientes com EM do estudo.



Nosso estudo demonstrou baixa expressão gênica de SIRT1 independente das topografias apresentadas (Gráfico 3). Apesar da patologia apresentar localizações típicas (visualizadas em RM) de apresentação, não existem áreas de predileção específicas para EM como existem, por exemplo, em pacientes com neuromielite óptica (NMO). Nestes últimos ocorrem sintomas neurológicos por disfunção neuronal em áreas abundantes de aquaporina 4 (área postrema, nervo óptico por exemplo) (PITTOCK et al., 2006). Talvez o perfil de expressão gênica de SIRT1, quanto à topografia, seja mais esclarecedor em pacientes com NMO do que pacientes com EM.

No presente estudo, os dois pacientes que apresentaram superexpressão de SIRT1 demonstraram surto em topografia medular, sendo ambos de idade mais avançada. No entanto, não dispomos de dados de literatura analisando perfil de expressão de RNAm de SIRT1 em relação à topografia do surto inicial de pacientes com EM.

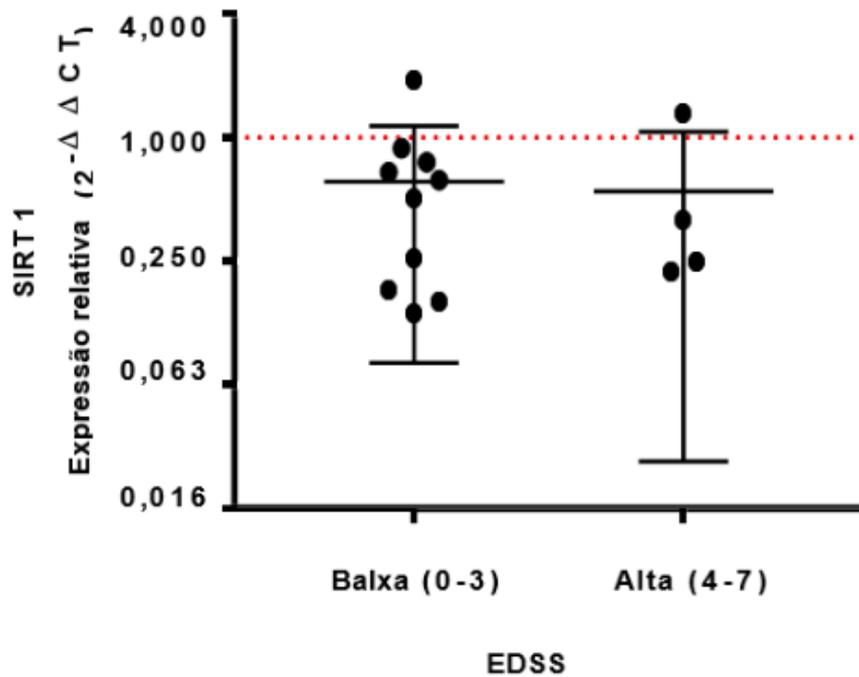
**Gráfico 3.** Expressão relativa de SIRT1 em relação à topografia do surto inicial nos pacientes com EM do estudo.



Em relação a escala EDSS, avaliamos quanto a mínima incapacidade (scores de 0-4) e incapacidade moderada a grave (4 ou mais). Importante frisar que a escala do EDSS apresenta críticas por valorizar demais queixas relacionadas à deambulação e destacar pouco outras funções também comprometidas com considerável frequência no curso da doença como disfunção cognitiva e fadiga. Os níveis de expressão de SIRT1 foram baixos (Gráfico 4), não sendo considerado um fator significante para este parâmetro. Apesar dos estudos em EM

realizados por HEWES et al. (2017) e TEGLA et al. (2014), EDSS não foi um dos parâmetro analisado pelos autores.

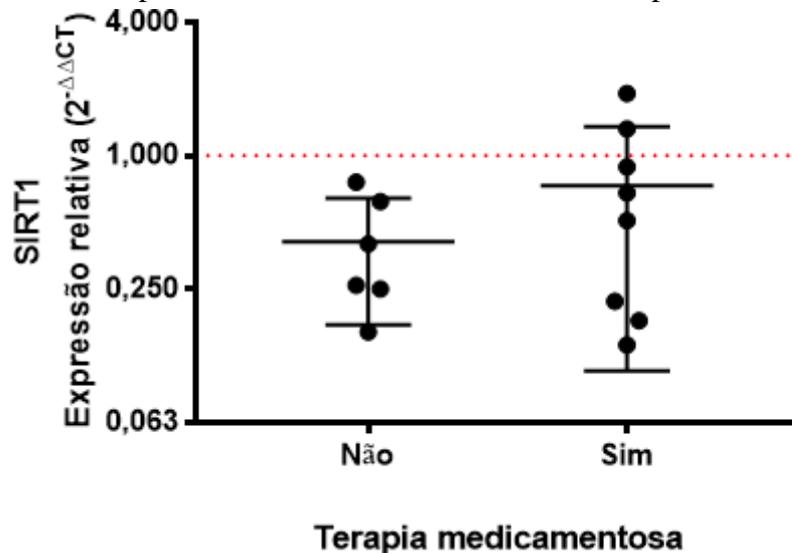
**Gráfico 4.** Expressão relativa de SIRT1 em relação a escala EDSS nos pacientes com EM do estudo.



Em relação à terapia medicamentosa, os pacientes com uso de medicação específica e sem ela demonstraram diminuição de expressão de SIRT1 (Gráfico 5). Um paciente, no entanto, em uso de Acetato de Glatiramer demonstrou aumento de 32% na expressão da SIRT1. Esse comportamento foi demonstrado em trabalho com pacientes americanos que faziam uso de Acetato de Glatiramer, relatando maior expressão de RNAm de SIRT1 e levantaram a possibilidade de tal análise ser usada como marcador de resposta à medicação (HEWES et al., 2017).

**Gráfico 5.** Expressão relativa de SIRT1 em relação à presença de terapia medicamentosa nos pacientes com EM do estudo.

Os dados apresentados demonstram uma baixa expressão de SIRT1 nas amostras de



pacientes com EM em relação aos parâmetros estudados. Tal fato é concordante com trabalho em população americana (TEGLA et al., 2014), no entanto nenhum estudo prévio foi identificado em pacientes da população brasileira.

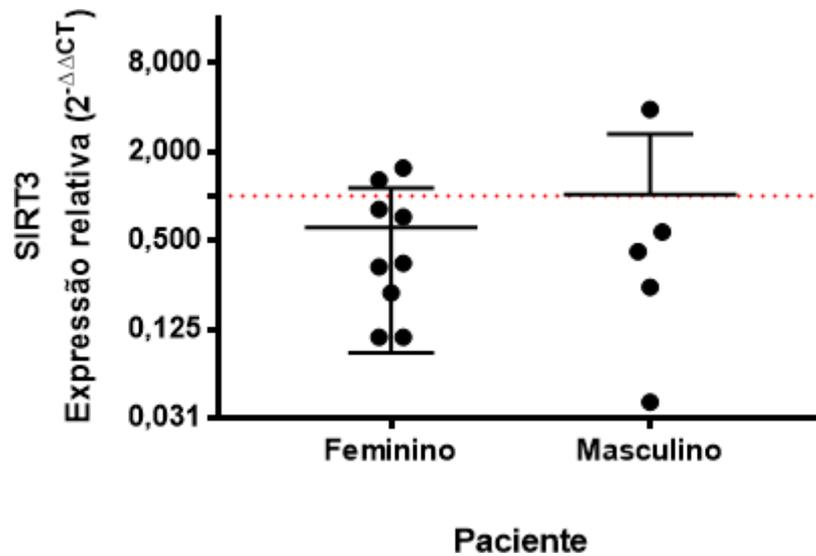
Devido à SIRT1 ser conhecida como molécula protetora em situações de estresse oxidativo, como observadas na EM, surge o questionamento se os níveis de expressão diminuídos são decorrentes do esgotamento deste composto diante de estresse oxidativo constante no curso da doença ou se o desencadeamento de resposta imune também promoveria bloqueio de vias metabólicas envolvidas com o metabolismo das sirtuínas logo no início da doença.

### 3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA SIRTUINA 3

Em relação à SIRT3, este é um trabalho pioneiro mundialmente considerando a análise de expressão do RNA mensageiro da SIRT3 em pacientes com esclerose múltipla. Esta molécula ainda não foi estudada em pacientes com outras doenças desmielinizantes, como neuromielite óptica e encefalomielite disseminada aguda.

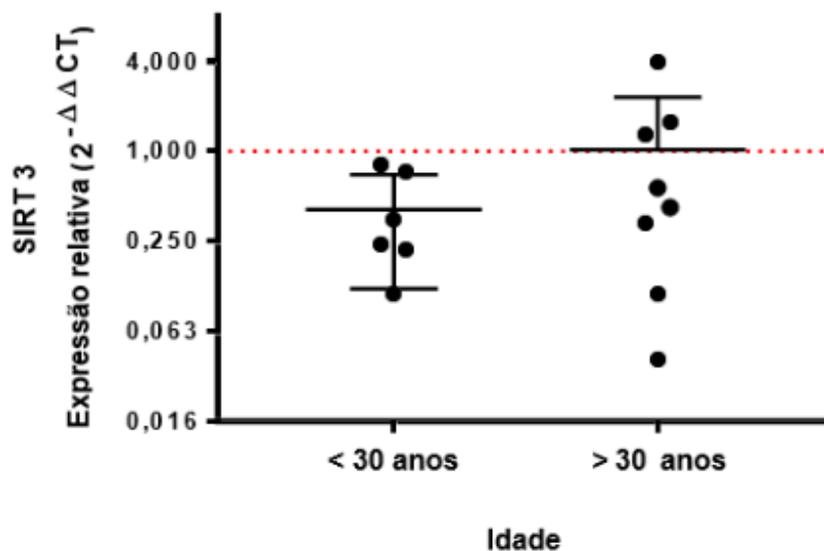
Em relação ao sexo, em geral os níveis de expressão gênica da SIRT3 apresentaram-se baixos, excetuando-se 3 pacientes, dois femininos e um masculino. No entanto, não se têm dados de expressão de RNAm de SIRT 3 na literatura em relação a sexo (Gráfico 6).

**Gráfico 6.** Expressão relativa de SIRT3 em relação a sexo nos pacientes com EM do estudo.



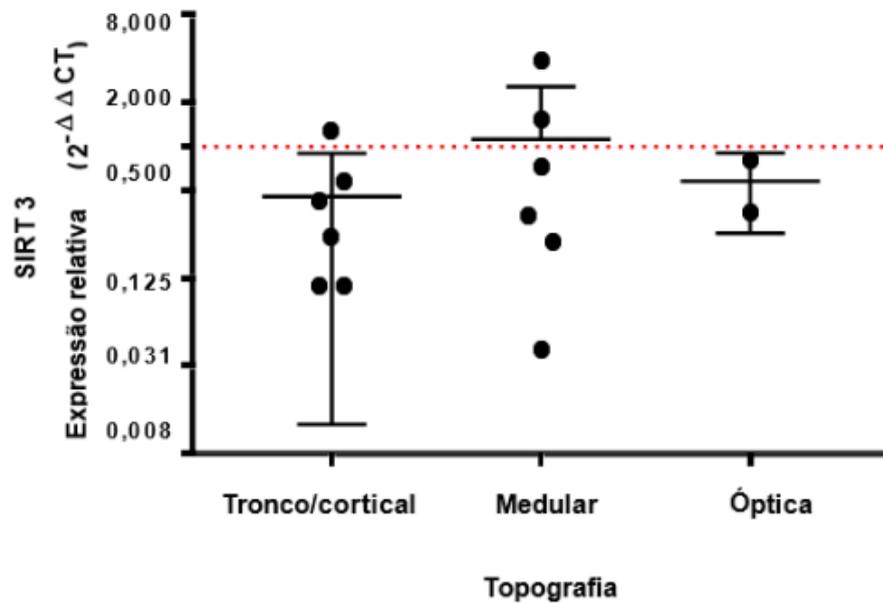
Por outro lado, pacientes com idade menor de 30 anos apresentaram baixos níveis de expressão de SIRT3 (Gráfico 7). No entanto, dentre os pacientes com idade maior que 30 anos, três apresentaram supressão de SIRT3, com idades de 39, 45 e 47 anos. Não foi observado um perfil relacionado à idade, como observado na análise de SIRT1, e não há relatos na literatura sobre os níveis de SIRT3 em pacientes com EM.

**Gráfico 7.** Expressão relativa de SIRT3 em relação à faixa etária nos pacientes com EM do estudo.



Em relação à topografia do surto inicial, nosso estudo demonstrou uma expressão diminuída nas três categorias (Gráfico 8), mais uma vez não sendo possível determinar um perfil de expressão gênica da SIRT3 nestes pacientes.

**Gráfico 8.** Expressão relativa de SIRT3 em relação à topografia do surto inicial nos pacientes com EM do estudo.

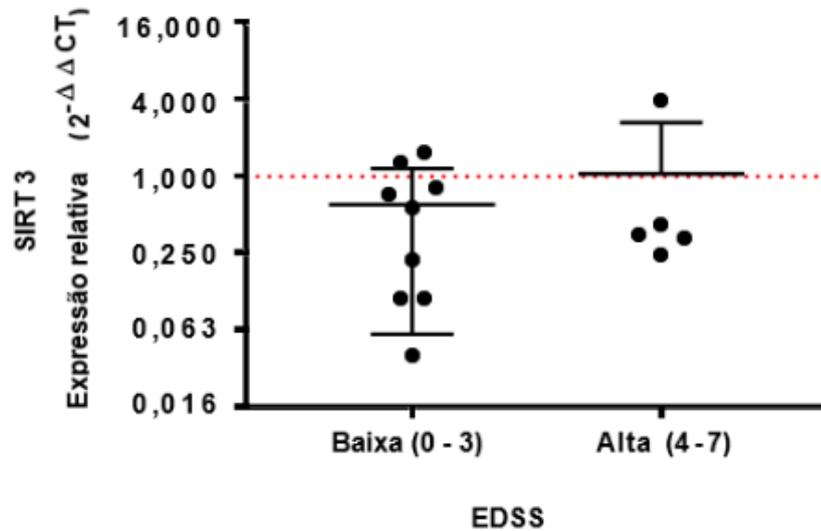


Entretanto, estudo em ratos e em necropsia de pacientes com doença de Alzheimer demonstrou expressão elevada de SIRT3 com diferenças topográficas, estando aumentada em 6 meses no hipocampo mas não sendo observada em cerebelo. Nesse caso, postulou-se um papel protetor da SIRT3 contra o estresse oxidativo observado ao longo do tempo (WEIR et al., 2012).

No momento, não podemos afirmar se a expressão de SIRT3 encontra-se diminuída devido ao fato da EM afetar precocemente as vias metabólicas relacionadas à SIRT3, o que levaria ao estresse oxidativo de forma mais evidente. Alternativamente, não se sabe se os níveis de SIRT3 poderiam aumentar ao longo do tempo como forma de desenvolvimento do mecanismo anti-oxidante. Neste aspecto, estudos desenvolvidos de acordo com o tempo de seguimento poderiam esclarecer esta questão.

Em relação ao EDSS, escala que avalia grau de incapacidade e gravidade da doença, observamos expressão diminuída de RNAm da SIRT3 (Gráfico 9). No entanto, o grupo de pacientes com escala mais alta de EDSS apresentam um perfil diferente do grupo de escala mais baixa, mostrando uma tendência de aumento da expressão de SIRT3.

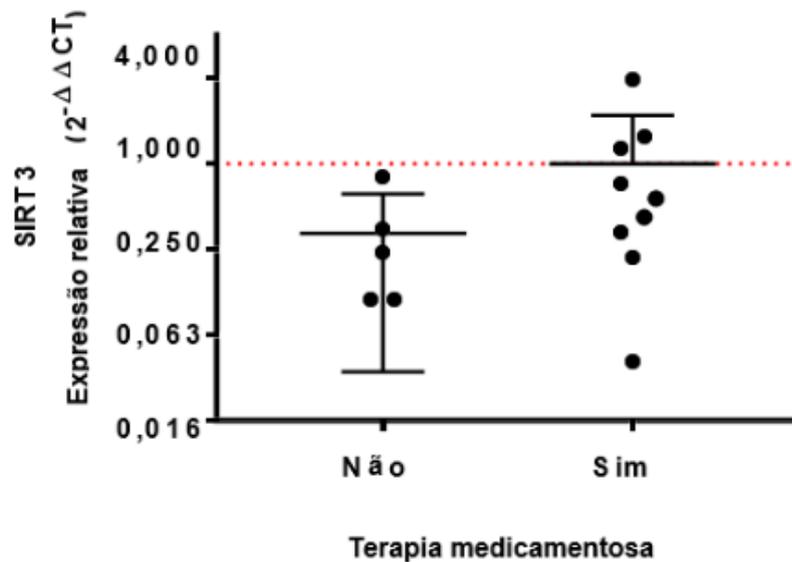
**Gráfico 9.** Expressão relativa de SIRT3 em relação a escala EDSS nos pacientes com EM do estudo.



Valores de EDSS elevados, a princípio, tendem a refletir doença mais grave e levantamos a hipótese de encontrar diferenças no perfil de expressão entre pacientes com doença incapacitante (EDSS>4) e não-incapacitante. No entanto, não dispomos estudos na literatura de avaliando o perfil de expressão com EDSS, nem em pacientes com EM, nem com outras doenças desmielinizantes. Desta forma, não se sabe se isso se deve a número pequeno de pacientes ou se a escala EDSS, além de deixar de analisar outras funções comprometidas na EM (funções cognitivas por exemplo), não apresenta correspondência com estresse oxidativo presente na doença. Tal análise também se aplica para SIRT1.

Quando avaliada a expressão gênica de SIRT3 em relação a terapia medicamentosa, observou-se um perfil de baixa expressão de SIRT3 em todos os grupos (Gráfico 10). No entanto, dois pacientes demonstraram aumento da expressão de SIRT3 com uso de Acetato de Glatirâmer, resultado também encontrado em 1 paciente na análise de SIRT1 e em estudo de população norte-americana (HEWES et al., 2017).

**Gráfico 10.** Expressão relativa de SIRT3 em relação à presença de terapia medicamentosa nos pacientes com EM do estudo.



Tanto SIRT1 e SIRT3 apresentaram casos em que expressão de RNAm foi alta em pacientes com uso de Acetato de Glatiramer. Tal droga, constituída como uma mistura de polipeptídeos, apresenta múltiplos mecanismos de ação e entre eles o estímulo à produção de citocinas anti-inflamatórias, a menor produção de fator de necrose tumoral alfa, e menor estresse oxidativo. Os estudos não esclarecem se Acetato de Glatiramer aumentaria a expressão de sirtuínas 1 e 3 por efeito direto nas vias metabólicas envolvidas com produção das mesmas, ou se ao interferir a nível de citocinas, diminuiria a resposta inflamatória, o estresse oxidativo, resultando em maior reserva antioxidante de SIRTs disponível.

Em comparação aos parâmetros estudados, a SIRT3 apresentou expressão diminuída de RNAm, um resultado esperado devido ao seu papel protetor em relação a estresse oxidativo. Além disso, é importante salientar que SIRT3 se localiza na mitocôndria com diversas funções nesta organela, principalmente quanto à garantia de funcionamento adequado da matriz energética da célula. Existem relatos de que em EM, observa-se injúria mitocondrial (NIKÍĆ et al., 2011) e isso poderia explicar os níveis de expressão baixos por esgotamento de reserva contra estresse oxidativo constante, de forma análoga ao observado com SIRT1.

Nossa avaliação dos dados torna-se limitada pelo número pequeno de pacientes, porém fornece indícios de que expressão de SIRTs 1 e 3 poderia exercer papel de biomarcadores em pacientes com EM, inclusive como parâmetros para avaliar resposta medicamentosa, como observado com acetato de glatiramer.

#### **4 CONCLUSÃO**

Estudo de pacientes com EM forma surto-remissão, em nossa população, parece apresentar diminuição da expressão de RNAm dos genes das SIRTs 1 e 3, o que pode refletir estresse oxidativo importante em pacientes com a doença.

Entretanto, mais estudos serão necessários para aumentar a força de associação destes achados e validá-los como possíveis biomarcadores para esta patologia autoimune.

## REFERÊNCIAS

AHLGREN, Cecilia; ODÉN, Anders; LYCKE, Jan. A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 18, n. 8, p. 1099–1107, 2012.

ALIAGA, Esther Sánchez; BARKHOF, Frederik. MRI mimics of multiple sclerosis. **Handbook of Clinical Neurology**, [s. l.], v. 122, p. 291–316, 2014.

BAECHER-ALLAN, Clare; KASKOW, Belinda J.; WEINER, Howard L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. **Neuron**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 742–768, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.01.021>>

BARRY, Michele; BLEACKLEY, R. Chris. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 6, p. 401–409, 2002. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nri819>>

BARUCH, Kuti et al. Aging-induced type I interferon signaling at the choroid plexus negatively affects brain function. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6205, p. 89–93, 2014.

BROWNLEE, Wallace J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10076, p. 1336–1346, 2017. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30959-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30959-X)>

CALLEGARO, D. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. **Acta Neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 208–213, 2001.

CANTÓ, Carles; MENZIES, Keir J.; AUWERX, Johan. NAD<sup>+</sup>Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 31–53, 2015.

CHOI, Sung R. et al. Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. **Brain**, [s. l.], v. 135, n. 10, p. 2925–2937, 2012.

COMABELLA, Manuel; MONTALBAN, Xavier. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 113–126, 2014.

COSORICH, Ilaria et al. High frequency of intestinal T<sub>H</sub> 17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. e1700492, 2017. Disponível em: <<http://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700492>>

CROSS, Anne H.; PICCIO, Laura. Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. **Multiple**

**Sclerosis and CNS Inflammatory Disorders**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 10–17, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2011.03.004>>

DA SILVA, Nilceia Lopes et al. Cost analysis of multiple sclerosis in Brazil: a cross-sectional multicenter study. **BMC Health Services Research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 102, 2016. Disponível em: <<http://bmchealthservres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12913-016-1352-3>>

DONMEZ, Gizem; OUTEIRO, Tiago F. SIRT1 and SIRT2: Emerging targets in neurodegeneration. **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 344–352, 2013.

FARH, Kyle Kai How et al. Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. **Nature**, [s. l.], v. 518, n. 7539, p. 337–343, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature13835>>

FEIGIN, Valery L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 877–897, 2017.

FIFEL, Karim. Sirtuin 3 : A Molecular Pathway Linking Sleep Deprivation to. [s. l.], v. 34, n. 28, p. 9179–9181, 2014.

FISCHER, Marie Therese et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. **Brain**, [s. l.], v. 136, n. 6, p. 1799–1815, 2013.

FRAGOSO, Yara Dadalti; PERES, Maristela. Prevalence of multiple sclerosis in the city of Santos , SP Prevalência de esclerose múltipla na cidade de Santos , SP. **Rev Bras Epidemiol**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 479–482, 2007.

FUENTES, Liza et al. HHS Public Access. [s. l.], v. 93, n. 4, p. 292–297, 2016.

GREENFIELD, Arielle L.; HAUSER, Stephen L. B Cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an Era. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 13–26, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.25119>>

HARKIOLAKI, Maria et al. T Cell-Mediated Autoimmune Disease Due to Low-Affinity Crossreactivity to Common Microbial Peptides. **Immunity**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 348–357, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.009>>

HARVEY, Nicholas C.; CANTORNA, Margherita T. Vitamin D and the immune system. **Diet, Immunity and Inflammation**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 244–263, 2013.

HEMMER, Bernhard; KERSCHENSTEINER, Martin; KORN, Thomas. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**,

[s. l.], v. 14, n. 4, p. 406–419, 2015. Disponível em:  
<[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70305-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70305-9)>

HEWES, Daniel et al. SIRT1 as a potential biomarker of response to treatment with glatiramer acetate in multiple sclerosis. **Experimental and Molecular Pathology**, [s. l.], v. 102, n. 2, p. 191–197, 2017.

HILA, Sorana; SOANE, Lucian; KOSKI, Carol Lee. Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. **Glia**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 68–77, 2001.

HOHLFELD, Reinhard et al. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: Autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 198–209, 2016. Disponível em:  
<[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00334-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00334-8)>

HOLLENBACH, Jill A.; OKSENBERG, Jorge R. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 64, p. 13–25, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.010>>

HOUTKOOPER, Riekelt H.; PIRINEN, Eija; AUWERX, Johan. Europe PMC Funders Group Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. [s. l.], v. 13, n. 4, p. 225–238, 2016.

HUBER, M.; HEINK, S.; PAGENSTECHE, A. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of**, [s. l.], v. 123, n. 1, 2013. Disponível em: <<https://www.jci.org/articles/view/63681/sd>>

INTERNATIONAL MULTIPLE SCLEROSIS GENETICS CONSORTIUM (IMSGC), BEECHAM AH, PATSOPOULOS NA, XIFARA DK, DAVIS MF, KEMPPINEN A, COTSAPAS C, SHAH TS, SPENCER C, BOOTH D, GORIS A, OTURAI A, SAARELA J, FONTAINE B, HEMMER B, MARTIN C, ZIPP F, D'ALFONSO S, MARTINE, McCauley JI. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. **Nat genet**, [s. l.], v. 45, n. 11, p. 1353–1360, 2013.

JI, Qingyong; CASTELLI, Luca; GOVERMAN, Joan M. MHC class I- restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8 + T cells. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 254–261, 2013.

KIPP, Markus et al. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 15–28, 2012.

KOHN, A. P. et al. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Antigen-Specific Autoreactive Immune Responses and Central Nervous System Inflammation During Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 169, n. 9, p. 4712–4716, 2002. Disponível em:

<<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.9.4712>>

KOZOVSKA, M. E. et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. **Neurology**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 1692–1692, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563614>><http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.53.8.1692>>

KUPIS, Wioleta et al. The role of sirtuins in cellular homeostasis. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 371–380, 2016.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1444–1444, 1983. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/WNL.33.11.1444>>

LAROCHELLE, Catherine et al. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 78, n. 1, p. 39–53, 2015.

LEE, Hyang Mi et al. A Broad Range of Self-Reactivity Drives Thymic Regulatory T Cell Selection to Limit Responses to Self. **Immunity**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 475–486, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.07.009>>

LEVIN, Lynn I. et al. of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. **Jama**, [s. l.], v. 293, n. 20, p. 2496–2500, 2005.

LIM, Hyung W. et al. SIRT1 deacetylates ROR $\gamma$ t and enhances Th17 cell generation. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 212, n. 6, p. 973–973, 2015. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.2013237805062015c>>

LOSSIUS, Andreas et al. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+T cells. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 44, n. 11, p. 3439–3452, 2014.

LU, Wei et al. Suppression of HIV replication by CD8+regulatory T-Cells in elite controllers. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, n. APR, p. 2–11, 2016.

LYNCH, Susan V.; PEDERSEN, Oluf. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 375, n. 24, p. 2369–2379, 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1600266>>

MARRIE, Ruth Ann. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. **The Lancet. Neurology**, [s. l.], v. 3, n. 12, p. 709–18, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442204009330>>

MILLER, Ariel et al. Treatment of multiple sclerosis with Copolymer-1 (Copaxone®): Implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 92, n. 1–2, p. 113–121, 1998.

MOLNARFI, Nicolas et al. MHC class II–dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 210, n. 13, p. 2921–2937, 2013. Disponível em: <<http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20130699>>

NIKIĆ, Ivana et al. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 495–499, 2011.

PARIHAR, Priyanka et al. Mitochondrial sirtuins: Emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. **Experimental Gerontology**, [s. l.], v. 61, p. 130–141, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2014.12.004>>

PATSOPOULOS, Nikolaos A. et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 9, n. 11, 2013.

PITTOCK, Sean J. et al. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. **Archives of Neurology**, [s. l.], v. 63, n. 7, p. 964–968, 2006.

RAJ, Towfique et al. HHS Public Access. [s. l.], v. 344, n. 6183, p. 519–523, 2016.

RANGARAJAN, P. et al. Sirtuin 3 regulates Foxo3a-mediated antioxidant pathway in microglia. **Neuroscience**, [s. l.], v. 311, p. 398–414, 2015.

ROUND, June L.; MAZMANIAN, Sarkis K. Inducible Foxp3+ regulatory T- cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 107, n. 27, p. 12204–12209, 2010.

SACK, Michael N.; FINKEL, Toren. Mitochondrial metabolism, sirtuins, and aging. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. a013102, 1 dez. 2012.

SANTOS, Leonardo; ESCANDE, Carlos; DENICOLA, Ana. Potential modulation of sirtuins by oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2016, 2016.

SARGSYAN, S. A. et al. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. **Neurology**, [s. l.], v. 74, n. 14, p. 1127–1135, 2010.

SCHMIDT, Angelika; OBERLE, Nina; KRAMMER, Peter H. Molecular mechanisms of Treg-mediated cell suppression. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 3, n. MAR, p. 1–20, 2012.

SIDOROVA-DARMOS, Elena et al. Differential expression of sirtuin family members in the developing, adult, and aged rat brain. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [s. l.], v. 6, n. DEC, p. 333, 2014.

SIMPSON, Steve et al. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: A meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [s. l.], v. 82, n. 10, p. 1132–1141, 2011.

SOLOMON, Andrew J. et al. The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis. **Neurology**, [s. l.], v. 87, n. 13, p. 1393–1399, 2016.

STEIN, M. S. et al. A randomized trial of high-dose vitamin D2 in relapsing- remitting multiple sclerosis. **Neurology**, [s. l.], v. 77, n. 17, p. 1611–1618, 2011.

TEGLA, Cosmin A. et al. SIRT1 is decreased during relapses in patients with multiple sclerosis. **Experimental and Molecular Pathology**, [s. l.], v. 96, n. 2, p. 139– 148, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.12.010>>

HOMPSON, Alan J. et al. Multiple sclerosis. **The Lancet**, [s. l.], v. 391, n. 10130, p. 1622–1636, 2018. a. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30481-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30481-1)>

THOMPSON, Alan J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 162–173, 2018. b.

VAQUERO, Alejandro. The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. **International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 53, n. 2–3, p. 303–322, 2009.

WEIR, Heather J. M. et al. CNS SIRT3 expression is altered by reactive oxygen species and in Alzheimer's disease. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 3–9, 2012.

YADAV, Sudhir K. et al. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 206–219, 2015.

YANG, Xiao et al. Sirt3 Mediates the inhibitory effect of adjuvant on astrocyte activation and glial scar formation following ischemic stroke. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 8, n. DEC, p. 1–12, 2017.

ZOZULYA, Alla L.; WIENDL, Heinz. The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. **Nature Clinical Practice Neurology**, [s. l.], v. 4, n. 7, p. 384–398, 2008.

## APÊNDICE A - ESCALA DE INCAPACIDADE FUNCIONAL EXPANDIDA

**Table 2. Kurtzke Expanded Disability Severity Scales (EDSS)**

Score	Description
0	Normal neurological examination
1	No disability, minimal signs in 1 FS*
1.5	No disability, minimal signs in >1 FS
2	Minimal disability in 1 FS
2.5	Mild disability in 1 FS or minimal disability in 2 FSs
3	Moderate disability in 1 FS, or mild disability in 3 or 4 FSs. Fully ambulatory.
3.5	Fully ambulatory but with moderate disability in 1 FS and more than minimal disability in several others
4	Fully ambulatory without aid, self-sufficient, up and about ~12 h/day despite relatively severe disability; able to walk without aid/rest for ~500 m
4.5	Fully ambulatory without aid, up and about much of the day, able to work a full day, may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance; characterised by relatively severe disability; able to walk without aid or rest for ~300 m
5	Ambulatory without aid or rest for ~200 m; disability severe enough to impair full daily activities (work a full day without special provisions)
5.5	Ambulatory without aid or rest for ~100 m; disability severe enough to preclude full daily activities
6	Intermittent or unilateral constant assistance (stick, crutch, brace) required to walk for ~100 m with or without resting
6.5	Constant bilateral assistance (stick, crutches, braces) required to walk for ~20 m without resting
7	Unable to walk beyond ~5 m, even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair for ~12 h/day
7.5	Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels him-/herself, but cannot carry on in standard wheelchair for a full day; may require motorised wheelchair
8	Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but may be out of bed much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms
8.5	Essentially restricted to bed much of the day; has some effective use of arms, retains some self-care functions
9	Confined to bed; can still communicate and eat
9.5	Totally helpless bed-bound patient; unable to communicate effectively or eat/swallow
10	Death due to MS

FS = functional system; FSs = functional systems; MS = multiple sclerosis.

\*Each system (visual, pyramidal, etc.) has a separate FS scale; scores are compiled to assist designation of the overall score.

(KURTZKE, 1983)

**APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UFPE****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Convidamos o (a) Sr. (a) \_\_\_\_\_

---

\_\_\_\_\_ para participar como voluntário (a) da pesquisa **Identificação de Biomarcadores Moleculares de Estresse Oxidativo em Doenças Neurológicas**. Esta pesquisa é da responsabilidade de Danyelly Bruneska Gondim Martins Telefone: (81988425594). Também participam desta pesquisa os pesquisadores: José Luiz de Miranda Coelho Inojosa, Telefone: (81991339586) e-mail luizmiranda108@hotmail.com e o pesquisador Kleiton de Barros Borges, Telefone: 81991864847 e e-mail: kleitonborges@hotmail.com.

Caso este Termo de Assentimento contenha informação que não lhe seja compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guardá-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

**INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:**

**Descrição da pesquisa:** A pesquisa objetiva estudar o perfil clínico (os sintomas da sua doença), epidemiológico (informações sobre a sua idade e onde você mora por exemplo) e molecular (estudar as substâncias que estão no seu corpo e podem provocar a doença) das doenças neurológicas acompanhadas no Hospital das Clínicas da UFPE a AACD. Serão solicitadas amostras de saliva e lágrima e cessão de parte de amostras de sangue, urina e líquido cefalorraquiano a depender da enfermidade estudada.

**Forma de participação:** A participação do/a voluntário/a consistirá em acompanhamento neurológico no ambulatório a que pertence no próprio Hospital das Clínicas da UFPE e AACD, em dias e horários de atendimento ambulatorial, ou durante a internação hospitalar, não alterando a rotina do tratamento. Serão coletadas 5ml de saliva e uma gota de lágrima em tubo coletor limpo. Também serão solicitadas parte das amostras dos exames de rotina de indicação médica: 10ml de urina e 20mL de sangue. Eventualmente uma parte da amostra de líquido cefalorraquiano (líquido da espinha que tem contato com o seu cérebro), que já seria coletado por fazer parte da investigação diagnóstica, será encaminhada para estudos.

**RISCOS diretos:** Pode haver um leve desconforto causado pela coleta de lágrima e de saliva, ou constrangimento por não saber ou não querer aceitar fazer parte do estudo. Como forma de amenizar, esses procedimentos de coleta serão realizados pela equipe técnica/enfermagem com experiência comprovada e o convite para participar será realizado de forma individual.

**BENEFÍCIOS diretos e indiretos** para os voluntários. Os pacientes podem ser beneficiados diretamente pelo melhor esclarecimento de seu perfil molecular (saber os tipos de substâncias que estão no sangue) e que podem estar relacionados com a sua doença para guiar as medicações mais apropriadas e de forma indireta contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas clínicas e diagnósticas. O paciente continuará sendo acompanhado no seu ambulatório de origem no Hospital das Clínicas da UFPE e na AACD.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa bem como dados dos prontuários, resultado do processamento do material biológico, fotos dos pacientes e das cópias fotográficas de seus devidos prontuários/fichas, exames de imagens neurológicas além de gravações em vídeo dos exames neurológicos, se houver esta necessidade, ficarão armazenados em pastas de arquivos dos computadores pessoais com backup em nuvem sob a responsabilidade dos pesquisadores Kleiton de Barros Borges e José Luiz de Miranda Coelho Inojosa, no endereço LIKA-UFPE localizado à Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária CEP:50.670-901, telefone 81-21268484 pelo período de mínimo 10 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores

(ressarcimento de transporte e alimentação). Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

---

(assinatura do pesquisador)

## CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

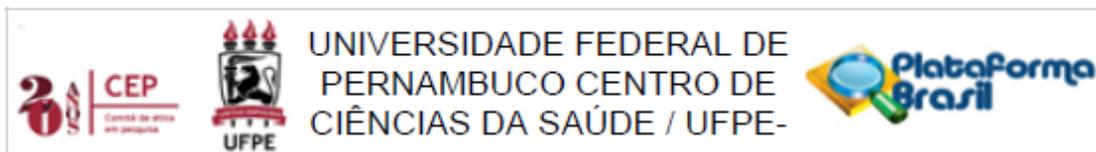
Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **Identificação de Biomarcadores Moleculares de Estresse Oxidativo em Doenças Neurológicas**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data

Assinatura do participante:

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):**

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

**APÊNDICE C - PARECER CONSUBSTANCIADO****PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES MOLECULARES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DOENÇAS NEUROLÓGICAS

**Pesquisador:** Danyelly Bruneska Gondim Martins

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 79091517.4.0000.5208

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**Patrocinador Principal:** MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.532.218

**Apresentação do Projeto:**

Projeto Relevante, busca marcadores moleculares de processos oxidativos

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar os aspectos clínicos, radiológicos e o perfil molecular de estresse oxidativo em pacientes com doenças neurológicas atendidas no estado de

Pernambuco, com intuito de detecção de possíveis alvos para diagnóstico precoce e novas abordagens terapêuticas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

todos presentes

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

nada consta. aprovar.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades