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

JOSÉ LUIZ DE MIRANDA COELHO INOJOSA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CATELICIDINA LL-37 EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

RECIFE
2019

JOSÉ LUIZ DE MIRANDA COELHO INOJOSA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CATELICIDINA LL-37 EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Orientadora: Profª. Drª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

RECIFE

2019

Catalogação na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Inojosa, José Luiz de Miranda C.
Análise do perfil de expressão de catelicidina LL-37 em pacientes com esclerose múltipla / José Luiz de Miranda C. Inojosa - 2019.
84 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos.

1. Esclerose Múltipla 2. Autoimunidade 3. Expressão gênica I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim (Orient.) II. Título

616.834 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2019-370

JOSÉ LUIZ DE MIRANDA COELHO INOJOSA

ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE CATELICIDINA LL-37 EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

Aprovado em 15/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Danyelly Bruneska Gondim Martins

Professora do Departamento de Bioquímica – UFPE

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Centro Acadêmico do Agreste – UFPE

Profª. Drª. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Departamento de Fisiologia e Farmacologia

A todos aqueles que me apoiaram na
realização desta jornada pelo mundo da ciência.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, Fonte Criadora, Inteligência Suprema e Causa Primária de todas as coisas. Aos pacientes, que tanto nos ensinam a ser melhores médicos e seres humanos melhores, mais humildes e mais gratos.

À minha orientadora Dra. Danyelly Bruneska, por ter me apresentado aos caminhos da pesquisa, pela paciência e dedicação. A Kleiton Borges por ter me apresentado e contribuído enormemente nesta jornada em biologia molecular.

À Patrícia e Amanda pelo desenvolvimento na parte técnica do projeto. Aos integrantes do ProspecMol por todo o exemplo inspirador.

À toda equipe de neurologia que com seu apoio permitiu que eu desenvolvesse esse projeto em especial a Dra. Clélia Franco e Dr. Márcio Andrade.

Agradecimento especial à Dra. Silvana Sobreira que viabilizou e me apoiou neste projeto.

Agradecimento especial à Dra. Laisa Barreto que sempre esteve disponível para me auxiliar e permitir que eu assistisse a todas as aulas.

Agradeço também a Kleber Valentim por todo apoio nesta trajetória.

Agradeço à Penélope Araújo por todos os conselhos e suporte.

Agradeço à minha mãe, Liege Miranda Coelho, por ter me dado o dom da vida.

O que sabemos é uma gota,

O que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença crônica, de caráter inflamatório que acomete o sistema nervoso central, com componente desmielinizante e, potencialmente, neurodegenerativo, cuja etiologia é presumivelmente autoimune. O desenvolvimento da EM pode estar ligado a fatores genéticos que tornam os indivíduos susceptíveis à doença, além de fatores ambientais como fumo, infecções e redução dos níveis séricos de vitamina D associada a baixa exposição solar. Diante de uma extensa revisão de literatura e analisando os inusitados fatores de risco para EM, principalmente os relacionados a vitamina D, julga-se necessário encontrar uma interface do ponto de vista molecular. É preciso ainda unir as hipóteses de que predisposições genéticas e interações com patógenos possam induzir respostas autoimunes com indução de citocinas e quimiocinas sobre as células da glia no desenvolvimento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas, tendo a EM forte componente de ambos os processos. Neste contexto, um importante grupo de moléculas surge como candidato para compreender o mecanismo de interação entre fatores de risco para lançar luz sobre terapias futuras e prevenção: a LL-37/Catelicidina. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar os níveis de expressão dos genes de LL-37, IL-10 e INFγ que podem estar relacionados ao desenvolvimento de EM e servir como marcadores da doença, seja para diagnóstico ou prognóstico. Nossos dados sugerem que o perfil de expressão desses três genes estava aumentado em pacientes com EM forma surto-remissão que haviam recentemente estado em períodos inflamatórios de surto clínico, bem como nos pacientes que apresentaram um pior prognóstico da enfermidade em curto período de observação evolutiva. A expressão negativa para estes genes esteve relacionada a pacientes de EM com excelente prognóstico ou mesmo a casos já avançados mas que se encontravam há anos sem surtos agudos da doença, indicando um “silêncio inflamatório” neste perfil de pacientes. Estudos com marcadores moleculares podem ser úteis no entendimento da patogênese desta condição, além da possibilidade de apresentar-se como biomarcador para definir o perfil do paciente com chance de desenvolver novos surtos e piora da incapacidade na fase inflamatória da doença, principalmente, antes de alcançar as formas secundárias.

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. Autoimunidade. LL-37. IL-10. INFγ

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory disease, which affects the central nervous system, with a demyelinating and potentially neurodegenerative component. The etiology is presumably autoimmune. The development of MS may be linked to genetic factors that make individuals susceptible to the disease, as well as environmental factors such as smoking, infections and reduced serum vitamin D levels associated with low sun exposure. After an extensive literature review and analyzing the unusual risk factors for MS, especially those related to vitamin D and others risk factors in association studies, we considered necessary to find a common connection between clinical aspects and molecular markers. Unify the hypotheses that genetic predispositions and interactions along pathogens can induce autoimmune responses that lead to induction of cytokines and chemokines on the glial cells is necessary. MS seems to be an excellent model as long as this disease presents an inflammatory and a neurodegenerative component associated to chronic inflammation. In this context, an important group of molecules appears as a candidate to understand the interaction mechanism between risk factors, mainly infections, in order to shed light on future therapies and prevention: LL-37 / Chatelicidine. Thus, the present study aimed to evaluate the expression levels of LL-37, IL-10 and INFG genes that may be related to the development of MS and serve as markers of the disease for diagnosis or prognosis. Our data suggest the expression profile of these three genes was increased in patients with relapsing-remitting MS, which had recently been in inflammatory periods of clinical outbreak, as well as in patients whose poor prognosis of the disease was demonstrated in a short observation period. The negative expression for these genes was related to MS patients performing an excellent prognosis or even with advanced disease but free of acute outbreaks for years. Such characteristics indicate an "inflammatory silence". Studies regarding molecular markers may be useful in understanding the pathogenesis of this morbid condition, as well as being able to present as a biomarker to define the profile of the patient in risk of developing new outbreaks or increasing disability during the inflammatory phase of the disease, before reaching secondary form.

Keywords: Multiple Sclerosis. LL-37. IL-10. INFγ

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características clássicas das lesões associadas a Esclerose Múltipla.....18
Figura 2 - Evolução gráfica da Esclerose Múltipla. 19
Figura 3 - Fatores de risco relacionados a EM. 25
Figura 4 -Zonas de exposição UVB em diferentes níveis do globo e seus níveis de suficiência durante o período do ano. 27
Figura 5 - Distribuição de casos de EM a cada 100.000 habitantes. 27
Figura 6 - Efeito da terapia anti-CD20 com preservação da reconstituição das células B pela célula tronco e da Pró-célula B, bem como da memória imune com as células plasmáticas de longa e curta duração. 32
Figura 7 - Evidência de que AMP's modulam resposta imune (coluna da direita) como recrutamento de células inflamatórias, indução de agentes pró ou anti-inflamatórios, ativação celular, proliferação e apoptose. 35
Figura 8 - Clivagem da hCAP-18 e liberação de LL-37. 36
Figura 9 - Caracterização da estrutura da LL-37. A) Estrutura molecular com 28 esqueletos de carbono; B) observar o formato helicoidal e C) Potencial superfície da LL-37 com as áreas em branco hidrofóbicas, resíduos ácidos em vermelho e básicos em azul.....37
Figura 10 - Perfil de atividade da LL-37 e sua função imunomodulatória. LL-37 adquire numerosas funções imunomodulatórias a depender do ambiente e do contexto celular. Exposição a LL-37 resulta no recrutamento de células inflamatórias, indução de macrófagos e ativação de inflamossomas via I INF. LL-37 também é expressa na superfície dos neutrófilos e, na presença do autoanticorpo Anti-LL-37, ocorre NETose gerando uma fonte adicional de complexos de DNA com LL-37. Entretanto, LL-37 também possui forte efeito anti-inflamatório ao neutralizar a ativação do TLR4 pelo LPS bacteriano, regulação com respostas de citocinas inflamatórias e impedindo invasão e resposta inflamatórias de bactérias patogênicas, especialmente nas criptas das vilosidades intestinais. 40
Figura 11 - Mecanismo hipotético pelo qual o fumo contribui como risco na Esclerose Múltipla. A ativação de vias inflamatórias e alterações pós translacionais em peptídeos podem levar a ativação de células T residentes autoimune CD4+ antígeno específico para o SNC.....41
Figura 12 - Expressão dos genes LL-37, IL-10, INFγ e IL-18.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de McDonalds 2017 para o diagnótico de EM 22
Tabela 2 - Drogas mais utilizadas no tratamento da Esclerose Múltipla..... 23
Tabela 3 - Lista de pacientes analisados com seus respectivos dados clínicos e positividade para expressão de LL-37, IL-10 e INFγ..... 49
Tabela 4 - Perfil clínico dos pacientes em uso de DMD que não expressaram LL-37, IL-10 ou INFγ. 53

SÚMARIO

1	**INTRODUÇÃO**	**13**
1.1	OBJETIVO	16
1.1.1	**Geral**	**16**
1.1.2	**Específicos**	**16**
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	**17**
2.1	Esclerose Múltipla	17
2.1.1	**Aspectos Gerais**	**17**
2.1.2	**Diagnóstico**	**17**
2.1.3	**Formas Clínicas, Evolução e Terapias Disponíveis**	**18**
2.1.4	**Fatores de Risco**	**24**
2.1.5	**Fatores Ambientais**	**26**
2.1.6	**Vitamina D**	**26**
2.1.7	**Tabagismo**	**28**
2.1.8	**Infecções**	**29**
2.2	Modelos da doença, Via Extrínseca e Intrínseca	30
2.2.1	**Células T autorreativas**	**30**
2.2.2	**Células B autorreativas**	**31**
2.2.3	**Células Regulatórias defectivas**	**32**
2.2.4	**Papel da Micróglia e Macrófagos**	**33**
2.3	Formas Progressivas	33
2.4	LL-37/Catelicidina	34
2.4.1	**LL-37, Vitamina D e Imunidade**	**37**
2.4.2	**Imunomodulação, Receptor de Vitamina D e LL-37**	**38**
2.4.3	**LL-37 e o Fumo**	**39**
2.4.4	**LL-37 e Demais Doenças Autoimunes**	**41**
2.4.5	**Resposta das células da Glia e Astrócitos a LL-37**	**42**
2.4.6	**Resposta imunológica associada de Interferons a LL-37**	**42**
3	**METODOLOGIA**	**43**
3.1	População de Estudo	43
3.2	Coleta de Amostras	43
3.3	Extração de RNA	43
3.4	Síntese de cDNA	44

3.5 Análise de expressão gênica..... 45
3.6 Análise estatística 45
4 RESULTADOS 46
4.1 Caraterização dos Pacientes 46
4.2 Expressão de LL-37 e citocinas 47
4.3 Pacientes em “silencio inflamatório” 53
5 DISCUSSÃO 56
6 CONCLUSÃO 62
REFERÊNCIAS 63
ANEXO A - KURTZKE EXPANDEDE DISABILITY SEVERUTY SACALES (EDSS) 77
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO 78
ANEXO C - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP 82
ANEXO D - PESQUISA SOBRE ASPECTOS CLÍNICOS 84

1 INTRODUÇÃO

A Esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, de caráter inflamatório que acomete o sistema nervoso central (SNC), com componente desmielinizante e potencialmente neurodegenerativo, cuja etiologia é presumivelmente autoimune. A doença caracteriza-se por um comportamento temporal de surtos agudos com fases de recuperação. O recrudescimento das incapacidades geradas nos surtos pode ser total ou parcial, porém, a depender da agressividade da enfermidade, pode evoluir com acúmulo progressivo de debilidade motora e cognitiva (HAIDER et al., 2016).

As lesões desmielinizantes podem atingir todo o encéfalo, toda medula espinhal e nervos ópticos, tendo portanto quadros clínicos múltiplos que decorrem do dano temporário ou permanente à bainha de mielina. Entretanto, tem ocorrido uma evolução nos estudos clínicos, radiológicos e imunológicos capazes de determinar a concomitância de lesões também aos corpos neuronais, ou seja, a doença não é mais tradicionalmente vista como exclusiva da substância branca, acometendo também a substância cinzenta, podendo progredir para neurodegeneração (CALABRESE et al., 2015). O dano oxidativo gerado pelo processo inflamatório em regiões corticais está fortemente associado ao dano aos oligodendrócitos, que, ao longo do tempo, esgotam suas capacidades de remielinizar áreas danificadas, com posterior degeneração de axônios e dendritos (FISCHER et al., 2013).

Como a enfermidade acomete, preferencialmente, adultos jovens, em fase ativa de trabalho, impacta fortemente a manutenção financeira dos setores de saúde. Dados mais consistentes de estudos europeus apontam um aumento constante dos custos relacionados a severidade da doença em suas fases progressivas e degenerativas. Leva-se em conta, também, o impacto das novas terapias que podem reduzir os custos de internações em períodos de surto. A precocidade do diagnóstico é um fator que pode contribuir com a manutenção dos fundos de saúde de estados e de setores privados, quando visam despender menos recursos para planos de reabilitação e complicações decorrentes de uma doença crônica incapacitante (KOBELT et al., 2017).

Como não existe um perfil molecular definido, nos deparamos com um gasto excessivo, não só para as terapias, bem como para o próprio diagnóstico e acompanhamento. Seja no número elevado de exames de Ressonância Magnética, seja nas reavaliações laboratoriais constantes associada aos gastos com reabilitação como mencionado acima.

Apesar dos esforços no sentido de encontrar biomarcadores, eminentemente diagnóstico da enfermidade, ou mesmo, preditores de bom ou de mau prognóstico, os resultados são bastante conflitantes, pois parece haver um perfil próprio para grupos populacionais de diferentes regiões geográficas. Ou seja, muitos estudos não conseguem ser replicados, especialmente no caso da nossa população, pois a maioria das análises são realizadas em populações do hemisfério Norte. Parece ainda haver distintos perfis genéticos para expressão de moléculas inflamatórias e do estresse oxidativo, o que exigirá um longo processo de caracterização populacional dessas vias metabólicas em nossa população.

Ao longo do processo de estudos da EM no Brasil, tentamos aplicar os mesmos achados de outras populações, para a nossa realidade. Todavia, alguns dados são conflitantes, principalmente em relação aos fatores de risco ambientais para desenvolver a doença. Por exemplo, a baixa exposição solar e a redução da vitamina D são achados clássicos associadas a EM, inclusive com vias moleculares bastante estudadas. Entretanto, o grau de radiação solar que temos no Nordeste do Brasil, por exemplo, é diferente do padrão de exposição solar em países do hemisfério norte, a despeito de encontramos níveis importantes de insuficiência na prática na nossa população (PEREIRA-SANTOS; YURE; QUEIROZ, 2018) (HARVEY; CANTORNA, 2013). Outros fatores de risco como tabagismo ativo e obesidade, são elementos muito ligados, atualmente, a problemas de saúde muito relevantes em populações do hemisférios norte, ainda que esteja se elevando em outras regiões do globo. Em importante artigo de revisão, sobre a Relação da EM com Fatores de risco, pródromos e potenciais vias causais da doença, é constantemente referido que as populações estudadas são, majoritariamente, de norte-americanos (Estados Unidos e Canadá) e europeias (principalmente suecos, dinamarqueses, britânicos e franceses). Aparecem citações a estudos na África do Sul ou Austrália porém ligados a migração de populações europeias brancas a esses países (RAMAGOPALAN et al., 2010).

É importante que levemos em conta que para a nossa posição geográfica e grau de exposição solar, existem, relativamente, poucos estudos sobre a fisiopatologia e vias causais nas nossas condições climáticas. Um fator causal muito bem estabelecido, e que parece se encaixar no perfil de nossa população, é a exposição a gatilhos infecciosos para as doenças autoimunes. As áreas tropicais estão constantemente relacionadas a circulação de vírus (que parecem ser os agente infecciosos mais implicados) que classicamente provocam outras doenças autoimunes em populações predispostas. Desta forma, é preciso estudar também tal relação em nossa população que é exposta a condições sanitárias precárias (principalmente durante a infância e adolescência), baixa qualidade e pureza da água, dificuldade de acesso a

tratamentos e prevenções médicas e odontológicas, além de baixo controle de circulação de vetores infecciosos, principalmente para arboviroses.

Então, faz-se necessário que os centros de estudos iniciem uma busca pelo perfil molecular de seus pacientes, de forma a poder compreender quais gatilhos e fatores de risco seriam mais relevantes para a nossa população. É preciso, ainda, compreender a necessidade de determinar de forma mais acurada o que ocorre, do ponto de vista imune, nos pacientes com evolução desfavorável (ocorrência de novos surtos e piora da incapacidade a despeito de estarem utilizando medicações). Partindo deste princípio, realizamos análise de expressão na nossa população atendida no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Desta forma, elegemos para esta análise a única catelicidina humana descrita até o momento, a LL-37/hCAP, pelo seu envolvimento na resposta imune inata e estudos em literatura que a relacionam como molécula capaz de levar a processos anti-inflamatórios como resposta ao contato do nosso sistema imune com patógenos (SØRENSEN et al., 2016). Ou seja, esta molécula pode estar na interface entre gatilhos infeciosos e a própria desregulação imune, pois o seu papel também já é descrito como elicitadora de respostas inflamatórias crônicas das células dos Sistema Nervoso Central, especialmente das células da glia (LEE et al., 2015). Além disso, a LL-37 está envolvida com o metabolismo imunomodulatório da Vitamina D, pois a interação com receptor desta vitamina que ativa a transcrição gênica da LL-37 (SVENSSON; NEBEL; NILSSON, 2016). Paradoxalmente, a LL-37 pode exercer um papel gerador de inflamação crônica, já associada a doenças autoimunes como Artrite Reumatoide (KAHLENBERG; KAPLAN, 2013) e Psoríases (CHAMORRO et al., 2009), porém sem avaliação direta em relação aos pacientes com doenças Desmielinizantes, especialmente a Esclerose Múltipla que é a doença alvo do nosso estudo. A LL-37 tem correlação com o tabagismo (KILSGÅRD et al., 2012) e as infecções pelo vírus Epstein-Baar (EBV) (GENNARO et al., 2018), outros dois importantes fatores de risco já estabelecidos para EM, mesmo que descritos para uma população diversa da nossa. Adicionalmente, investigamos a Interleucina-10 (IL-10) e o Interferon γ (INFγ) como moléculas promotoras da regulação imune inflamatória, com perfis estudados e associados entre si, bem como moléculas de perfil inflamatório como IL-6 e IL-18.

O esforço na análise do perfil molecular, associado a dados clínicos, é um passo importante para caracterização do comportamento imunológico na Esclerose Múltipla, dentro das nossas condições ambientais e perfil de fatores de risco mais prováveis para a nossa população.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Geral

Analisar o padrão de expressão dos genes da LL-37 em pacientes com esclerose múltipla de um hospital universitário, visando determinar se estas moléculas contribuem para a fisiopatologia da doença.

1.1.2 Específicos

- Analisar o padrão de expressão dos genes da LL-37 em pacientes com Esclerose Múltipla forma surto-remissão em comparação com controles saudáveis;

- Determinar os níveis de expressão de IL-06, IL-10, IL-18 e INFγ no mesmo grupo de pacientes com Esclerose Múltipla;

- Determinar se os níveis de expressão da LL-37 tem correlação com as citocinas avaliadas;

- Determinar se os níveis de expressão da LL-37 e das citocinas tem associação com o quadro clinico dos pacientes com esclerose múltipla e se podem ser influenciados pela terapia medicamentosa prescrita.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Esclerose Múltipla

2.1.1 Aspectos Gerais

Apesar de ser uma enfermidade de ocorrência mundial, é mais comum em indivíduos caucasianos do norte da Europa e mais rara entre asiáticos e africanos, apresentando relativamente baixa prevalência em regiões equatorianas. Em várias populações estudadas existe sempre um declínio de incidência de altas para baixas latitudes do globo, alertando para aspectos ambientais, além dos genéticos (CORREALE; FAREZ, 2011).

Assim como a maioria das doenças autoimunes, as mulheres são mais acometidas em uma proporção de 3:1 tanto em dados brasileiros quanto em dados nas Américas e Europa (MARQUES et al., 2018)(C. et al., 2013).

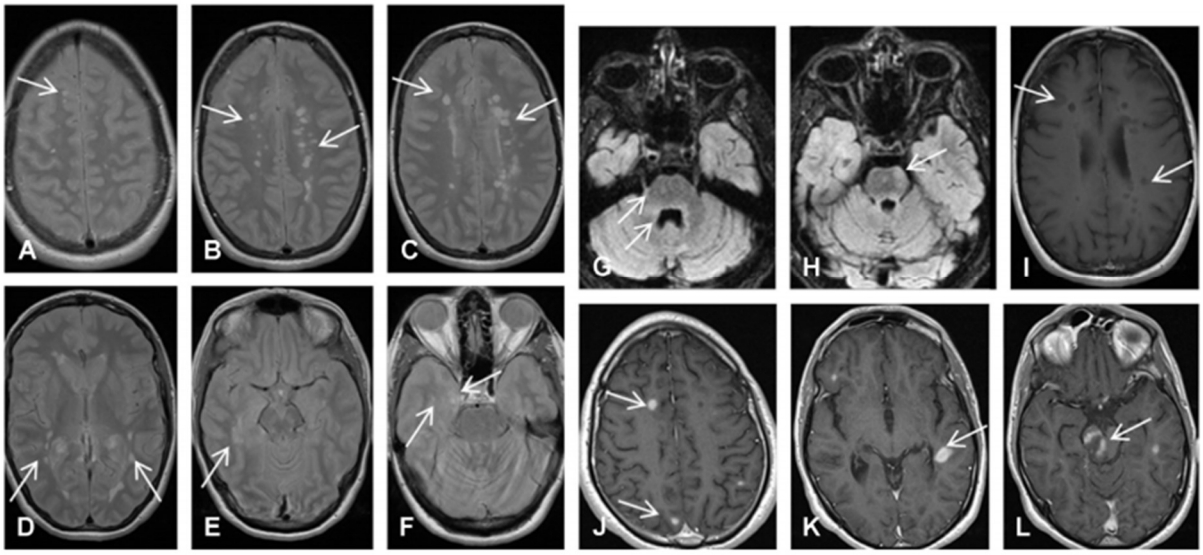
Os sintomas clássicos mais comuns são quadros de neurite óptica com acometimento preferencialmente unilateral; visão dupla por oftalmoplegia internuclear ou lesão do sétimo nervo craniano unilateral; dormência em face ou dor facial característica de neuralgia trigeminal; nistagmo e ataxia cerebelar; sintomas de mielite parcial; alterações diversas da sensibilidade com padrão de acometimento central, presença do sinal de Lhermite (sensação similar a choque elétrico percebido durante flexão da região cervical); déficit de força em membros de padrão assimétrico bem como disfunção erétil, incontinência ou urgência vesical. Declínio cognitivo, sintomas depressivos e fadiga crônica, que são de difícil mensuração, também fazem parte desse amplo espectro de sintomas clínicos. Síndromes álgicas são queixa constantes e sub-tratadas nestes pacientes (ALIAGA; BARKHOF, 2014).

2.1.2 Diagnóstico

Considerada ainda uma enfermidade sem um biomarcador específico, diferente do que ocorre na Neuromielite Óptica, com a detecção do Anticorpo Antiaquaporina 4, a investigação é considerada do tipo diagnóstico de exclusão (a exclusão das demais causas levam ao diagnóstico) por outras enfermidades que simulem a Esclerose Múltipla do ponto de vista de exames de imagem ou de comportamento clínico. A eliminação de outras doenças exige a aplicação de um dispendioso painel laboratorial para doenças hormonais tireoidianas, comprometimento sifilítico, infecções virais incluindo retrovírus e arboviroses, deficiência de vitamina B12, auto-anticorpos para as doenças autoimunes potencialmente graves que acometam o SNC, vasculites, trombofilias e leucoencefalopatias (ALVES-LEON et al., 2018). Além disso, faz-se necessário exames mais invasivos como estudo do líquido cefalorraquiano

(LCR), bem como enorme carga de exames de Ressonância Magnética (RM) do Sistema Nervoso Central (SNC) (Figura 1) (DA SILVA et al., 2016) (PRYCE; BAKER, 2018).

Figura 1. Características clássicas das lesões associadas a Esclerose Múltipla



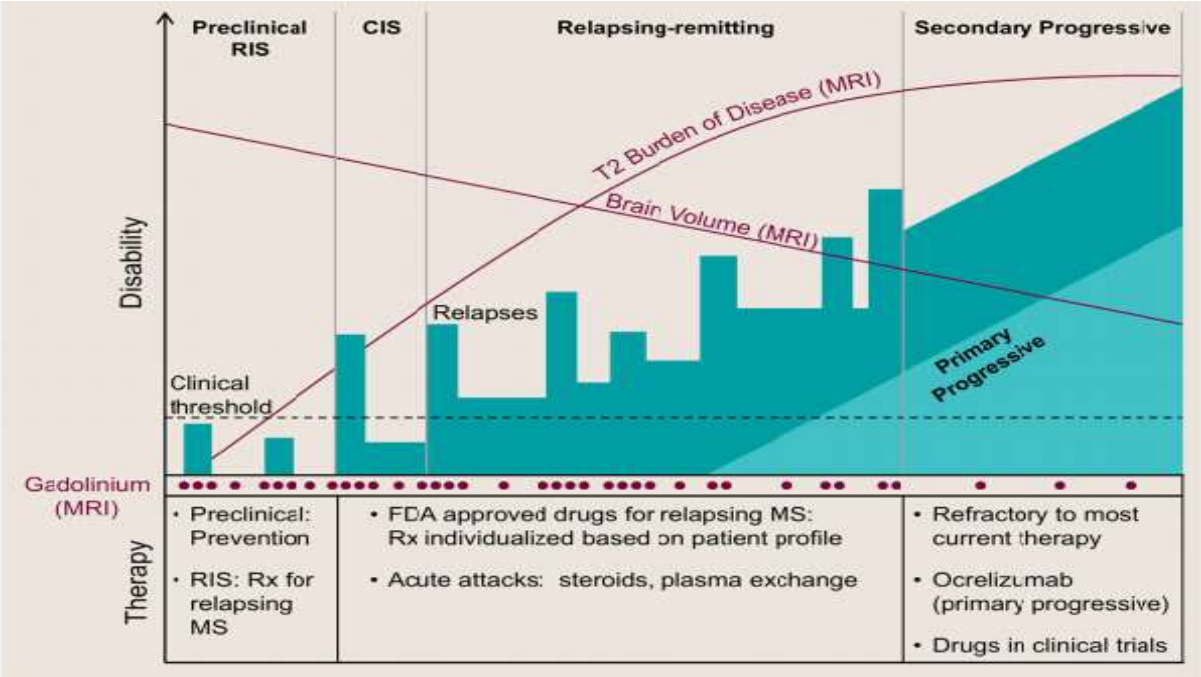
De A à F, na sequência de Densidade de Prótons, em RM, é possível observar lesões pequenas, bem delimitadas, ovaladas em posição justacortical (A); ao redor dos ventrículos laterais (B e C); na região do trígono (D e E), em região temporal (F). Na sequência FLAIR (Fluid Attenuated Inversion Recovery) demonstram-se lesões na emergência do nervo trigêmeo (G), na superfície pial do tronco encefálico (H). Na sequência ponderada em T1, observamos Black-holes (I) que correspondem à áreas desmielinizadas. Na sequência pós-contrastada em T1 observamos padrão nodular (J e K) e em anel incompleto (L).

Fonte: Handbook of Clinical Neurology, Vol. 122 (3rd series) page 292 Multiple Sclerosis and Related Disorders

2.1.3 Formas Clínicas, Evolução e Terapias Disponíveis

A doença pode ser encontrada sob a forma de estágios evolutivos (Figura 2). Ela compreende um estágio pré-clínico, detectável apenas por RM de encéfalo e medulas. Nesta forma, também conhecida como RIS (do inglês *Radiologic Isolated Syndrome* descrita na figura 2 como *Preclinical-RIS*) são percebidos focos de atividade inflamatória ainda sem repercussão clínica, mas que já expressam a quebra de barreira hematoencefálica (BBB do inglês *Blood Brain Barrier*) com captação do contraste gadolíneo e o ataque imune aos componentes do SNC. Em geral, esta fase é detectada como achado incidental durante propedêutica de investigação para cefaleias ou traumatismos cranianos, por exemplo, ou por qualquer outra investigação que exija exame de imagem encefálica ou medular (THOUVENOT, 2018).

Figura 2. Evolução gráfica da Esclerose Múltipla.



Fonte: Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy Clare Beacher-Allan,1 Belinda J. Kaskow,1 and Howard L.

Na grande maioria dos pacientes, essa fase de RIS é sequer detectada visto que, de modo geral, inicia-se investigação a partir dos surtos clínicos já estabelecidos, quando o paciente apresenta os sintomas mais comuns. A partir deste ponto, existe a possibilidade de estarmos diante de uma Síndrome Clínica Isolada (convencionou-se chamar CIS do inglês *Clinical Isolated Syndrome*), ou seja, ocorre concomitância de ser o primeiro sintoma e de haver apenas uma única lesão em topografia que justifique o fenômeno clínico descrito pelo paciente ou observado no exame neurológico. Nesta etapa, ainda não se considera Esclerose Múltipla tipicamente definida. Em outra situação, durante o primeiro surto clínico, os achados de RM podem revelar lesões antigas em diferentes estágios inflamatórios e em múltiplas localizações dentro do SNC, representando a ocorrência de uma disseminação temporal dos achados e também uma disseminação ao longo das áreas do SNC (disseminação no espaço) o que configuram uma forte característica da Esclerose Múltipla (HEIDI; MALONI, 2013).

Esta fase é conhecida como período ou forma de surto e remissão (SR ou EMSR), que seria a forma RR (do inglês *Relapsing Remitting* descrito na figura 2). Nesta etapa, encontram-se a maioria dos pacientes recém diagnosticados e também é o melhor momento para iniciar os tratamentos propostos, pois configura uma excelente janela terapêutica para impedir o avançar da história natural da doença. Sem tratamento, inexoravelmente, ocorrerá comprometimento constante do SNC por novos surtos (sejam eles clínicos, subclínicos ou assintomáticos) com acúmulo progressivo de incapacidades ao longo do tempo. A etapa degenerativa é atingida pela

exaustão dos mecanismo de recuperação cerebral (YADAV et al., 2015). Observamos na Figura 2, picos quadrados que podem ou não retornar a linha de base ou podem crescer e apresentar platôs cada vez mais altos relacionados ao acúmulo de incapacidades. Observamos também que seguem as detecções de lesões com captação do contraste gadolínio (pontos em vermelho na Figura 2) evidenciando atividade inflamatória não controlada pelos mecanismos regulatórios imunológicos.

Nesta fase ou forma da doença os surtos agudos devem ser tratados, respeitando a gravidade e duração dos sintomas com terapias disponíveis para redução de atividade inflamatória tais como: pulsos diários de altas doses de corticoides, Imunoglobulina Humana ou até mesmo considerar Plasmaferese (PRIETO GONZÁLEZ, 2014). Também nesta etapa estão indicadas todas as terapias consideradas Drogas Modificadoras da Doença (DMD), que devem ser escolhas individualizadas. É possível ainda perceber uma curva ascendente de acúmulo de cargas de lesões, vistas na RM de SNC, que se relaciona de forma aproximadamente inversa a perda progressiva de volume cerebral (curvas na Figura 2, T2 *Burden of the Disease MRI* e *Brain Volume MRI*, respectivamente). Diante de tais achados podemos inferir que ocorra uma exaustão dos mecanismos regulatórios manifestado por perda de volume cerebral sobrejacente ao quadro de surtos agudos da doença (CALDITO et al., 2018).

Entretanto, se houver falha da terapêutica, com um avanço da história natural da enfermidade, os pacientes podem alcançar uma fase em que os surtos clínicos passam a ser pouco perceptíveis. Os métodos de aferição, ao menos dos sintomas motores, demonstram um claro acúmulo lento e progressivo das incapacidades ao longo do tempo, independente da ocorrência de surtos. A esta fase chamamos de Secundariamente Progressiva (SP ou EMSP), caracterizando-se pela refratariedade às terapêuticas habituais e a inusitada falta de captação de contraste demonstrada nos exames de imagem regulares de acompanhamento. Este fenômeno sugere um segundo mecanismo, lento e progressivo, que perpetua a perda de volume cerebral com consequentes sintomas motores, instalados muito lentamente, e um agravamento dos sintomas cognitivos, depressivos e álgicos (KUHLE et al., 2016).

Importante salientar que existe a forma Primariamente Progressiva (PP ou EMPP), afetando até 15% dos pacientes, logo no início da doença (descrito como *Primary Progresive* em verde claro na figura 2). Nesta forma pode existir atividade inflamatória com captação do contraste gadolínio na RM de encéfalo, ou de medula, sem que haja relação com a piora clínica que segue de forma lentamente progressiva e incapacitante. Até recentemente, sequer havia terapêutica para esta forma da doença, sendo liberada a primeira medicação, o anticorpo

monoclonal anti-CD20 (Ocrelizumabe), aprovado em 2017 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (BROWNLEE et al., 2017).

O diagnóstico da EM sofreu grande evolução, ocorrendo nova revisão dos critérios de McDonald em 2017 (Tabela 1). Porém é preciso cautela na interpretação dos novos critérios que podem passar a impressão de uma melhora no prognóstico associado a terapêutica precoce, quando na verdade pode estar ocorrendo a detecção precoce da doença, ou mesmo acompanhamento eminentemente da fase inflamatória ainda com boa recuperação das incapacidades (THOMPSON et al., 2018).

É preciso reconhecer ainda que podem ocorrer vieses bioestatísticos devido ao fator ético de não poder haver grupo controle sem tratamento da doença. Dito isto, a grande preocupação ainda é a fase degenerativa da enfermidade. Não se pode deixar de reconhecer a importância da evolução dos critérios, pois um erro de diagnóstico pode ter consequências fatais e incapacidade acentuada por manutenção do *continuum* inflamação e neurodegeneração (THOMPSON et al., 2018).

Tais revisões dos critérios diagnósticos para EM visam sempre estimular a precocidade do diagnóstico para aumentar a chance de sucesso terapêutico, apesar de ser necessário manter certa crítica, como descrito acima. A existência de janelas terapêuticas parecem ser múltiplas, pois mesmo que ocorra neurodegeneração ao longo da enfermidade, existem evidências de que as intervenções podem preservar as funções de membros superiores, apesar do comprometimento de longas vias neuronais, como das funções esfincterianas e da mobilidade de membros inferiores. Pode ainda haver uma maior preservação das funções cognitivas e visuais a cada nova intervenção terapêutica que retenha a história natural da doença (GIOVANNONI, 2017).

Tabela 1. Critérios de McDonald 2017 para o diagnóstico de EM

Número de surtos clínicos	Número de lesões em RM com evidência clínica objetiva	Dados adicionais para o diagnóstico de EM
2 ou mais	2 ou mais	Não
2 ou mais	1 (paciente deve ter uma clara evidencia 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 clinico 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 clinico ou por RM ou por BOC no liquor

Fonte: Critérios revisados de McDonalds 2017 traduzidos para português.

No Brasil, existem medicamentos novos sendo aprovados para distribuição pelo Governo Federal por comissões que analisam os dados de resposta clínica, os impactos financeiros para o sistema de saúde e o impacto orçamentário global. Na Tabela 2, dispusemos os principais medicamentos, suas datas de aprovação pelo *Food and Drugs Administration* (FDA), os alvos terapêuticos, os mecanismos de ação, a resposta esperada, e os principais efeitos adversos.

Tabela 2. Drogas mais utilizadas no tratamento da Esclerose Múltipla

DROGA/ Aprovação FDA	ALVO	MECANISMO DE AÇÃO	EFICÁCIA	EFEITOS ADVERSOS	REFERÊNCIAS
INFβ1A e 1B (1993)	Liga-se ao receptor de INF tipo 1	Inibe a migração pela BBB, a divisão das células T e induz Treg	Redução da taxa anual de surtos	Reações flu-like pós aplicação, hepatotoxicidade e depressão	(Bermel et al., 2012)
Acetato de Glatiramer (1997)	Ligação ao MHC	Competição por peptídeo pelo MHC e aumenta interleucinas anti-inflamatórias	Redução da taxa anual de surtos	Reações locais de pele e linfadenopatia	(Racke & Lovett-racke, 2010)
Teriflunomida (2012)	Inibe a Dihidro-orotato-desidrogenase	Inibe síntese de pirimidinas e reduz clones de células T ativadas	Redução da taxa anual de surtos	Teratogênese, Hepato-toxicidade, queda de cabelo	(Comi et al., 2011)
Fingolimode (2010)	Receptor de Esfingosina 1-Fosfato	Sequestro linfocitário reversível em linfonodos	Redução da taxa anual de surtos	Bradicardia, infecções, edema de mácula	(Willis & Cohen, 2013)
Dimetil-Fumarato (2013)	Via do NrF2	Ativa a via transcripcional do Nrf2	Redução da taxa anual de surtos	Flushing, sintomas gástricos e linfopenia	(Kappos et al., 2005)
Natalizumabe (2004)	Integrina α4	Bloqueia a migração de célula B e T para o SNC	Redução da taxa anual de surtos	Reações infusionais e risco de LEMP	(Sellebjerg et al., 2015)
Ocrelizumabe (2017)	Anti CD20 de células B	Depleta CD20/ Reduz a apresentação de antígenos patogênica pelas células B	Redução da taxa anual de surtos e redução da progressão em EMPP	Reação infusional, risco de Câncer de mama e baixo risco de LEMP	(Sorensen & Blinkenberg, 2016)
Alemtuzumabe (2014)	CD52 em células B e T	Depleção de células B e T	Redução da taxa anual de surtos	Tireoidite, Púrpura e Glomerulo-nefrites	(Havrdova, Horakova, & Kovarova, 2015)
Cladribina (2017)	Adenosina Deaminase	Induz apoptose de linfócitos	Redução da taxa anual de surtos	Infecções e linfopenia	(Rammohan & Rieckmann, 2010)

Flu-like: termo amplamente usado em estudos de EM para designar sintomas gripais após aplicação das Interferonas; MHC: do inglês *Major Histocompatibility Complex* (Complexo Maior de Histocompatibilidade); NrF2: do inglês *Nuclear fator like-2;* LEMP: Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva.
Fonte: Adaptada de *Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy* Baecher-Allan, Clare Kaskow, Belinda J.Weiner, Howard L.

2.1.4 Fatores de Risco

O desenvolvimento da Esclerose Múltipla pode estar ligado a fatores genéticos que tornam os indivíduos susceptíveis à doença (Figura 3). Em estudos de famílias específicas, o alto risco de desenvolvimento de EM chegou a ser 10-25 vezes maior em parentes de primeiro grau de pessoas acometidas do que na população em geral, juntamente com o sexo do indivíduo que faz aumentar esse risco, neste caso o sexo feminino (PIA SORMANI, 2009).

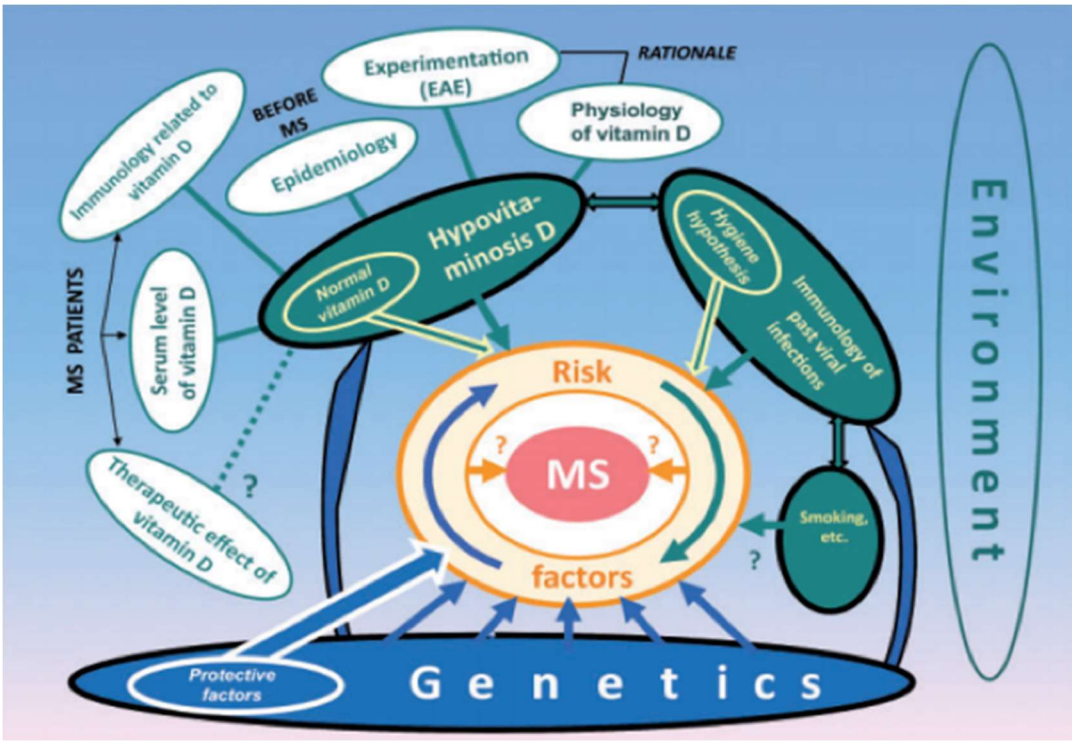
A região do antígeno leucocitário humano (HLA) no cromossomo 6 apresenta papel de destaque e tem sido relacionada a uma gama de doenças autoimunes. Por exemplo, pacientes com a variante HLA DRB1*15:01 apresentam risco 3 vezes maior de apresentar esclerose múltipla em relação a controles saudáveis (PATSOPOULOS et al., 2013). De uma forma geral, acredita-se que ocorra envolvimento de vias metabólicas relacionadas ao conceito de tolerância imunológica, bem como comprometimento da função de linfócitos T por anormal responsividade a citocinas, por exemplo. No entanto, apesar da importante contribuição dos estudos de associação em Esclerose Múltipla, investigações mais profundas (como epigenômica e a transcriptômica) fazem-se necessárias para fortalecer a relevância das variantes encontradas (FARH et al., 2015).

A baixíssima prevalência da doença entre afro-americanos (quase 40% menos risco que o norte-americano branco), indígenas norte-americanos, mexicanos, porto-riquenhos, japoneses e a escassez da doença entre os chineses e filipinos leva a pensar que o aparecimento da doença esteja submetida a fatores genéticos (RAMAGOPALAN et al., 2010).

Epidemiologicamente, observa-se o efeito do parente afetado, principalmente do parentesco materno. Esses indivíduos, cuja mãe seja comum a todos eles, apresentam o dobro de risco de desenvolver Esclerose Múltipla comparado com os indivíduos ligado por parentesco paterno afetado (2,35% versus 1,31%, p=0,048). O risco de ligação maternal quando comparado com indivíduos que possuíam a mesma mãe e o mesmo pai não teve diferença estatística significativa. O mecanismo de aumento de risco materno ainda não foi totalmente elucidado, entretanto, mecanismos epigenéticos (alterações da cromatina e do DNA, incluindo metilação deste no nucleotídeo C-G e regulação das histonas que regulam a função genômica)

tem sido fortemente implicados (CHAO et al., 2009). Apesar da doença ser mais prevalente em mulheres na proporção de 3:1, os estudos genéticos não fornecem um suporte convincente para atribuir associação a genes no cromossomo X, de forma que, infere-se que essa maior incidência possa estar relacionada a fisiologia específica hormonal feminina (ORTON et al., 2006).

Figura 3. Fatores de risco relacionados a EM.



Fonte: Pierrot-Deseilligny, C., & Souberbielle, J.-C. (2010). Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? Brain, 133(7), 1869–1888.

Muitos países tem apresentado um aumento no número de mulheres acometidas nas últimas décadas, além do esperado, que não podem ser explicadas por uma mudança tão rápida da composição genética. Entretanto, pode ser justificado pelas mudanças de estilo de vida, aumento do fumo e atrasos nos períodos reprodutivos (KOCH-HENRIKSEN; SØRENSEN, 2010) (MAGYARI et al., 2013). Existem ainda fatores de risco que afetam ambos os gêneros como infecção por vírus Epstein Baar (EBV) e baixos níveis de Vitamina D, bem como obesidade (principalmente na adolescência), exposição a solventes orgânicos e turnos noturnos de trabalho também podem estar ligados à doença. O conjunto desses novos elementos foram considerados fatores ambientais para Esclerose múltipla (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016).

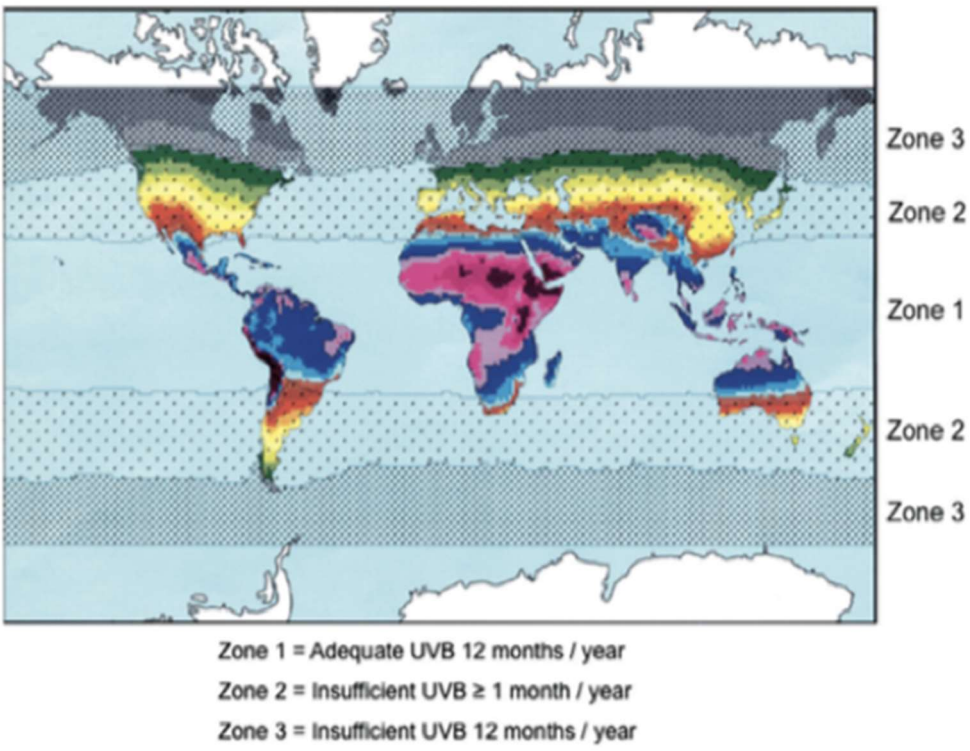
2.1.5 Fatores Ambientais

Apesar de reconhecermos que a genética tem um papel relevante, o estilo de vida e os fatores ambientais parecem exercer um importante papel na susceptibilidade individual de desenvolver EM. A primeira observação neste sentido foi o fato de existir áreas de maior prevalência da doença em regiões de altas latitudes no globo, ou seja, próximo ao equador teremos menos casos e quanto mais nos afastarmos para as áreas mais frias, mais distante do equador, teremos mais casos (SIMPSON et al., 2011). Porém, em estudos de migração, ficou claro que quando os indivíduos migram antes da adolescência eles adquirem o risco daquela região. Este fato sugere que as duas primeiras décadas de vida são cruciais na influência do risco da doença e que muitos fatores ambientais agem na adolescência (AHLGREN; ODÉN; LYCKE, 2012).

2.1.6 Vitamina D

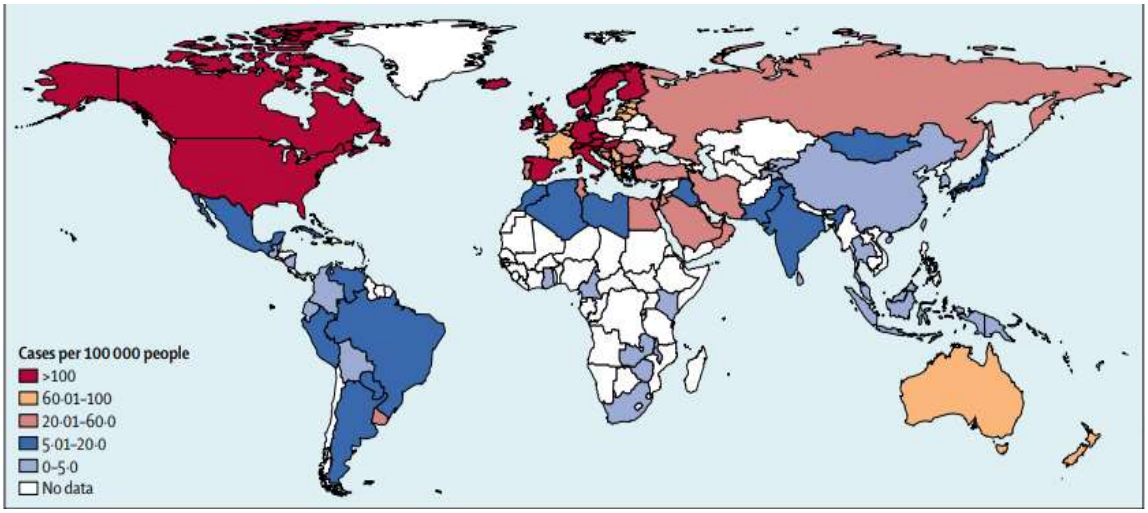
A susceptibilidade latitudinal está associada com os níveis de exposição solar e aos níveis séricos de vitamina D (Figura 4), que pode ser comparado à distribuição mundial da doença (Figura 5), conforme observado no Atlas de Esclerose Múltipla de 2013 gerada pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF). Pode haver um componente independente na modulação imunológica da própria radiação ultravioleta, entretanto dados mais robustos sugerem que a vitamina D pode suprimir a proliferação de linfócitos B e T. A resposta celular pode ser desviada da célula T, de uma reação inflamatória, para uma reação regulatória e ainda promover fenótipos mais tolerogênicos (HARVEY; CANTORNA, 2013). A vitamina D apresenta ainda evidência de um perfil imunomodulatório através da expressão de Interferons Gama e interleucina 10 (IL-10) (RAGAB et al., 2016). Em virtude dessas evidência de estudos de associação entre baixos níveis da vitamina D e o desenvolvimento de doenças autoimunes (GREER et al., 2013) (ROSSINI et al., 2010) (PIERROT-DESEILLIGNY; SOUBERBIELLE, 2010), tornou-se uma prática médica comum a reposição desta vitamina para os pacientes de EM (STEIN et al., 2011).

Figura 4. Zonas de exposição UVB em diferentes níveis do globo e seus níveis de suficiência durante o período do ano.



Fonte: Journal of Human Evolution (2000) 39, 57–106

Figura 5. Distribuição de casos de EM a cada 100.000 habitantes.



Fonte: Atlas de Esclerose Múltipla 2013 gerada pela Federação Internacional de Esclerose Múltipla (MSIF)

A questão da vitamina D é muito mais complexa do que apenas monitorar os seus níveis circulantes, pois várias células autoimunes expressam receptores para vitamina D (RVD) e a disruptura da homeostase entre defesa e doença autoimune também perpassa sobre fatores

promotores da transcrição do receptor da vitamina; da afinidade com ácido retinóico como cofator para a ligação com o DNA; a atuação de interleucinas inibitórias sobre a transcrição como a IL-2; a interação com outros fatores de transcrição complexos e proteínas inflamatórias; a interação com glicocorticóides e hormônios sexuais, notadamente o estrogênio; as modificações pós-translacionais da molécula do receptor bem como da capacidade de monócitos e macrófagos possuem em estimular os RVD nas demais células do sistema imune para promover a ativação secundária da produção de peptídeos antimicrobianos, notadamente as catelicidinas (YIN; AGRAWAL, 2014).

2.1.7 Tabagismo

O fumo é outro fator de risco bem reconhecido, ligado tanto ao desenvolvimento da doença quanto à severidade, que medeia respostas de linfócitos Th17 no interstício pulmonar (WINGERCHUK, 2012). Por sua vez, o tabaco oral, pode estar ligados ao baixo risco de desenvolvimento de Esclerose Múltipla (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016).

A resposta imune ao fumo pode ser tão diversa que não é somente um risco de desenvolver a doença, mas também aumenta as chances do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes contra imunobiológicos, utilizados no tratamento, incluindo Natalizumabe (anticorpo monoclonal dirigido contra a integrina alfa 4, molécula que possibilita a adesão leucocitária na barreira hematoencefálica e posterior invasão do SNC) e Interferon Beta-1A (imunomodulador da resposta imune na Esclerose Múltipla) (HEDSTRÖM et al., 2014). O fumo passivo também é apontado como aumento de risco para EM e, potencialmente, os poluentes do ar também poderiam elicitar respostas imunes que sejam gatilhos para neuroinflamação (HEYDARPOUR et al., 2014) (HEDSTRÖM et al., 2011).

Em modelos de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) em roedores foi bem demonstrado que linfócitos T podem alcançar, pela circulação sanguínea, o SNC após permanecer em tecidos pulmonares. Esses linfócitos são drenados pelos linfonodos mediastinais, após passagens pelo epitélio e alvéolos do pulmão, onde reprogramam seus genes para expressar moléculas de locomoção e receptores de adesão celular que incluem a ninjurin 1. Esta molécula permite o rolamento dos linfócitos T pelas paredes dos vasos cerebrais de modo que o pulmão constitui um nicho não apenas de ativação de linhagens imunes mas também de reservatório de células T de memória reativas a mielina. Após o estímulo local pulmonar, essas células imunes se replicam fortemente e assumem suas propriedades migratórias, ou seja, estímulos potencialmente tóxicos podem permitir a invasão do SNC (ODOARDI et al., 2012).

2.1.8 Infecções

Existem hipóteses de que alguns vírus poderiam desencadear a doença, principalmente em virtude dos altos títulos de anticorpos contra o Epstein-Baar vírus (EBV) em pacientes com EM e mielites extensas, mas não está claro como o vírus poderia contribuir com a doença, se através de mecanismos de mimetismo molecular ou através da regulação de linfócitos B. Há trabalhos que relacionam a infecção por EBV com outras doenças autoimunes como Lúpus Eritematoso Sistêmico, por exemplo (HARLEY; JAMES, 2006).

O papel da microbiota ganhou destaque recentemente por modular o tecido Linfoide Associado a Mucosas (MALT, do inglês *Mucosal Associated Lymphoid Tissue*) tanto para a saúde ou quanto para os estados patológicos. Esses microrganismos influenciam na susceptibilidade a infecções, desenvolvimento de cânceres, resposta metabólica, inflamatória e na autoimunidade (LYNCH; PEDERSEN, 2016). Adicionalmente, pesquisas recentes afirmam que os ligantes de triptófano derivado do receptor de aril-hidrocarboneto (AHR) produzidos pelas bactérias intestinais comensais podem alcançar o SNC e modular a função de astrócitos para suprimir a inflamação e a neurodegeneração (ROTHHAMMER et al., 2016). Recentemente, também foi demonstrado que elevada proliferação de Th17 intestinal se correlaciona com alterações da microbiota e com a agressividade da EM (COSORICH et al., 2017).

Um exemplo de provável relação da interação da microbiota com a expressão de doenças desmielinizantes é a especificidade das células T de pacientes com Neuromielite Óptica (NMO), que reconhece o epítopo imunodominante da aquaporina-4 e exibe uma polarização para a linhagem Th17 capaz de fazer reação cruzada com epítopos do *Clostridium perfringens* (ZAMVIL et al., 2018) . Neste estudo, observou-se uma abundância significativa deste microrganismo comensal em paciente com NMO, diferente do observado em pacientes com EM que teriam populações de microbiotas intestinais distintas. Na suspeita de que formas mais agressivas da Esclerose Múltipla sejam mediadas pela linhagem Th17, o estudo da microbiota ganha destaque no entendimento da fisiopatologia da enfermidade (CREE et al., 2016).

Pode-se dizer que o estudo da microbiota sucedeu a Hipótese da Higiene que pairava sobre inúmeras doenças autoimunes desde a observação da diferença de incidência de enfermidades autoimunes e o crescimento dos casos de alergia nos países industrializados, que apresentam melhor grau de profilaxia vacinal e melhores condições de saneamento básico (WENDEL-HAGA; CELIUS, 2017). Tal hipótese sugere que uma baixa exposição a patógenos durante a infância levaria a um desequilíbrio entre as células Th1 e Th2, porém um possível

aumento da linhagem Th2 só explicaria um maior número de casos de alergia. Hoje, a hipótese da higiene compreende os estudos do descompasso entre a imunidade inata e a adquirida desde que se compreendeu melhor o papel da linhagem Th17, Th1 e Treg na Esclerose Múltipla (CREE et al., 2016).

2.2 Modelos da doença, Via Extrínseca e Intrínseca

Os estudos moleculares e de linhagem celulares sobre Esclerose Múltipla apontam para uma via particular que envolve a imunidade adaptativa, principalmente relacionada a linfócitos B e Linfócitos T, juntamente com células Natural Killer (NK) e células da própria micróglia do SNC. Adicionalmente, observam-se linfócitos T CD4 e CD8 dentro das lesões inflamatórias, enquanto nas formas progressivas, detecta-se centros de germinação ectópica contendo outras populações imunes, principalmente linfócitos B (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018). Postula-se então uma via chamada Extrínseca, em que o linfócito T CD4 seria ativado na periferia e então migraria para dentro do SNC, sendo reestimulado por células apresentadoras de antígenos, levando a perpetuação da ativação e do recrutamento de macrófagos periféricos. Em hipótese oposta, a via Intrínseca teria o gatilho imune decorrente de disfunção imunológica dentro do próprio SNC do indivíduo (MALPASS, 2012).

2.2.1 Células T autorreativas

De uma forma geral, a hipótese do modelo extrínseco é mais popular por sua maior reprodutibilidade clínica e experimental como a EAE. Linfócitos T autorreativos seriam estimulados na periferia e se enquadrariam em um perfil eminentemente inflamatório. Tais células invadiriam o sistema nervoso central por quebra da barreira hematoencefálica e propiciariam início do dano neuronal. Destas células T autorreativas, em estudos em humanos, encontram-se células T CD4 com predomínio dos subtipos Th1 e Th17, precocemente no curso da doença. Células Th1 promovem produção de interferon γ (INF-γ) e fator de necrose tumoral α (TNF-α), enquanto que as células Th17 produzem as interleucinas (IL) IL-17, IL-21 e IL-22 bem como INF-γ. 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 (YADAV et al., 2015).

Um dos mecanismos de ação de terapias modificadoras da doença de primeira linha como INF-γ e Acetato de Glatiramer consiste em estabelecer, farmacologicamente,

diferenciação para uma maior resposta Th2, desviando das respostas Th1 e Th17 (KOZOVSKA et al., 1999) (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 (GOBIN; MONTAGNE; ZUTPHEN, 2001).

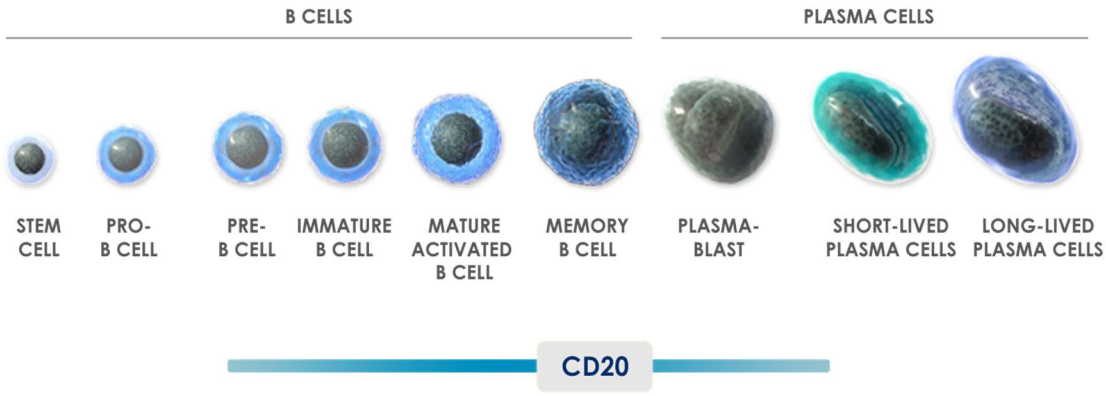
Células T CD8 altamente reativas à bainha de mielina dos neurônios são encontradas com frequência em pacientes com EM. Tais células secretam INF-γ e IL-17 (HUBER et al., 2013), promovem dano axonal por sua função citotóxica e, em modelo animal, promovem maior migração transendotelial a nível de barreira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

2.2.2 Células B autorreativas

Os efeitos animadores da terapia anti-CD20 (Ocrelizumabe) em pacientes com esclerose múltipla destacam a importância das células B na patogênese da doença, apesar da EM ser, até recentemente, considerada um patologia de células T, 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 (GREENFIELD; HAUSER, 2018).

Formas progressivas primárias parecem manifestar comportamento diverso já que manifestam infiltrado meníngeo difuso sem estas estruturas linfoides terciarias (CHOI et al., 2012). As células B autorreativas, além da capacidade de liberar anticorpos, podem, na Esclerose Múltipla, induzir a produção de citocinas e apresentação de antígenos para as células T. Confirmando este fato, um estudo 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).

Figura 6. Efeito da terapia anti-CD20 com preservação da reconstituição das células B pela célula tronco e da Pró-célula B, bem como da memória imune com as células plasmáticas de longa e curta duração.



Fonte: Imagem adaptada de: Krumbholz M, *et al*. *Nat Rev Neurol* 2012;8:613–623.

As células B do tipo CD20 expressam esta complexo proteico desde a célula Pré-B até a formação da célula B *naive* madura e da célula B de memória, sendo perdida nos plasmócitos. Como resultado as terapias anti-CD20 poupam as células B imaturas e os próprios plasmócitos (MICHEL et al., 2014). Desta forma, os benefícios da terapia anti-CD20 parecem fundamentados 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. De modo que especialistas na área afirmam que as terapias anti-CD20 tendem a ter aplicação tanto nas formas remitentes e recorrentes tanto nas formas progressivas, sejam elas primarias ou secundárias (HAUSER et al., 2017).

2.2.3 Células Regulatórias defectivas

Acredita-se que as células autorreativas em EM 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. Estas 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 da 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 por 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 autoimunes.

2.2.4 Papel da Micróglia e Macrófagos

O estudo das funções dos macrófagos e da micróglia, a despeito de controversa, levanta inúmeras questões que fazem o campo de estudo dessas células um grande ponto de interseção entre neurociência e imunologia (KAHLENBERG et al., 2013). Do ponto de vista da Esclerose Múltipla é preciso que se compreenda que mesmo que os estudos em terapia farmacológicas avancem no sentido de inibir a atividade de linfócitos T ou depletar linfócitos B ou T, as células efetoras finais dos ataques imunes, principalmente nas fases iniciais, serão os macrófagos circulantes que migram através da barreira hematoencefálica danificada (VAN DER DOES et al., 2010).

2.3 Formas Progressivas

Durante o desenvolvimento das etapas do processo inflamatório dos surtos da doença, o ambiente das lesões e das meninges constituem a melhor fase de compreensão e descrição em literatura. Entretanto, apesar de compreender melhor a história natural da doença, é imperativo estudar o perfil das apresentações progressivas.

Durante o curso da Esclerose Múltipla os paciente de formas Surto-Remissão (EMSR) evoluem, inexoravelmente, para formas progressivas caracterizadas por acúmulo de incapacidades, independente da ocorrência de surtos clínicos novos ou novas lesões identificadas em exames de imagem. A forma primariamente progressiva é notável pelo curso clínico inicial que se dá normalmente sem surtos, já com envolvimento de longas vias neurológicas, o que geralmente implica em deterioração gradativa da marcha, atingindo marcos de incapacidade muito mais precocemente quando comparado com a forma EMSR (CONFAVREUX; VUKUSIC, 2006). A coletânea de dados de estudos disponíveis sobre a história natural da doença dá suporte a noção de que, dentro de uma perspectiva clínica e

estatística, as formas secundariamente e primariamente progressivas são mais similares do que diferentes. Deste modo, é preciso ampliar as pesquisar para encontrar ou determinar marcadores moleculares comuns em ambas as formas. Inicia-se uma tendência a revisar os gatilho de doenças neurodegenerativas e autoimunes e o exemplo mais recente são os achados que implicam as infecções pela *Porphyromonas gingivalis* como responsável por inflamação a nível cerebral com forte relação com a Doença de Alzheimer esporádica (SINGHRAO; OLSEN, 2018) (DING et al., 2018).

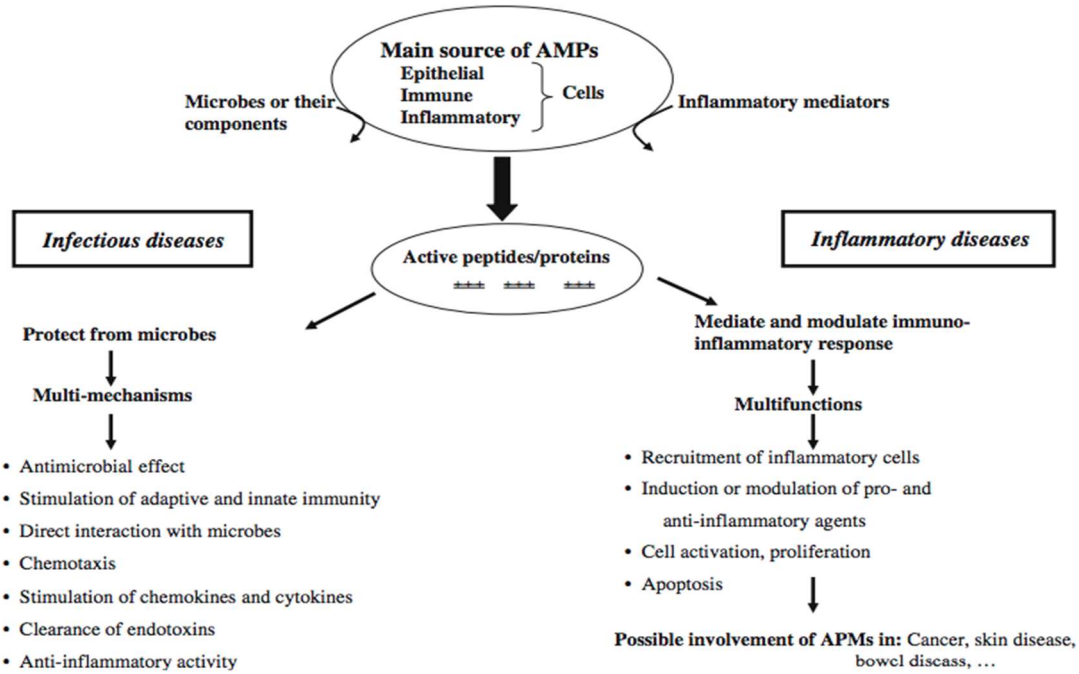
Um desafio central é elucidar como a depleção de linfócitos B pelos anti-CD20 possuem um efeito dramático na abolição dos surtos e um efeito que consideraríamos razoável nas formas progressivas primárias, estudando-se, ainda, os efeitos nas formas secundárias (CASTILLO-TRIVINO et al., 2013). Novas terapias anti-CD20 podem reduzir em até 88% as lesões captantes de contraste nos exames de imagem e reduz ainda o número de linfócitos T no sangue periférico, em torno de 20%, e no Líquido Cefalorraquiano, em torno de 50%. Esses dados apontam um efeito modulador do sistema imune quando linfócitos B, que ainda não se tornaram plasmócitos, são depletados, fazendo decrescer também as células T (NAISMITH et al., 2010).

2.4 LL-37/Catelicidina

Analisando os inusitados fatores de risco para Esclerose Múltipla, principalmente os relacionados a vitamina D, e os demais fatores de risco em estudos de associação, julga-se necessário encontrar uma interface do ponto de vista molecular. É preciso ainda unir as hipóteses de que predisposições genéticas e interações com patógenos podem induzir respostas autoimunes com indução de citocinas e quimiocinas sobre as células da glia no desenvolvimento de doenças inflamatórias e neurodegenerativas, tendo a Esclerose Múltipla forte componente de ambos os processos.

O sistema imune inato tem papel crucial na defesa contra inúmeros micro-organismos bem como no início das respostas inflamatórias. Os Peptídeos/Proteínas Antimicrobianas (AMP's do inglês *Antimicrobial Peptide/Protein*) possuem potente atividade contra um grande número de microrganismos e dão cobertura contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, demais parasitas e alguns vírus especialmente os envelopados (VISWANATHAN; HECHT, 2000)(GENNARO; ZANETTI, 2000). Os AMP's constituem um importante mecanismo de defesa evolucionário, conservado contra invasão dos organismos eucariontes, uma vez que centenas de AMP's são sintetizados pelo tecido epitelial e pelas células de defesa (Figura 7) (BEVINS, 2006)(WANG, 2004).

Figura 7. Evidência de que AMP's modulam resposta imune (coluna da direita) como recrutamento de células inflamatórias, indução de agentes pró ou anti-inflamatórios, ativação celular, proliferação e apoptose.

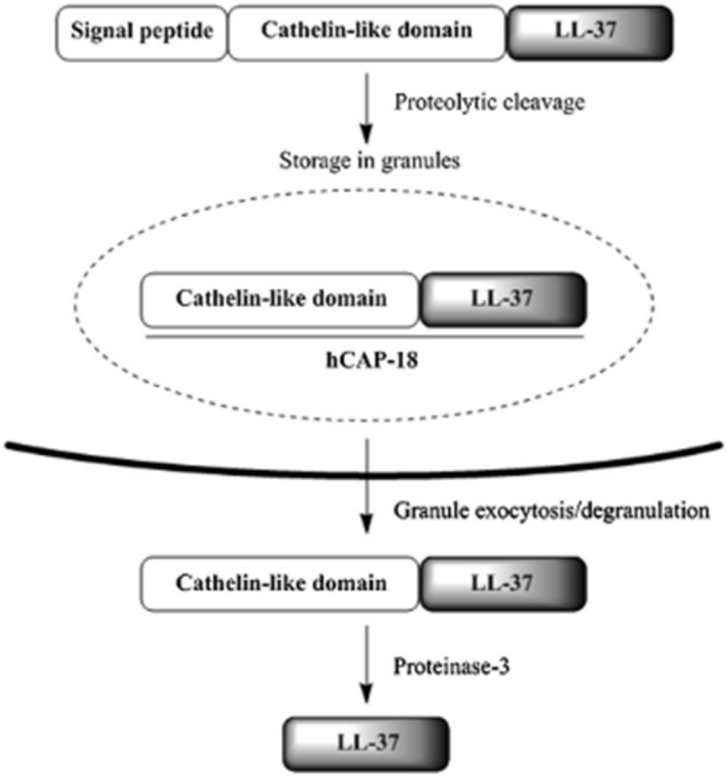


Fonte: Zaiou, M. (2007). Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. Journal of Molecular Medicine, 85(4), 317–329.

Neste contexto, uma importante molécula surge como candidata para compreender o mecanismo de interação entre fatores de risco (principalmente os infecciosos) e para lançar luz sobre terapias futuras e prevenção: a LL-37/Catelicidina.

O peptídeo catiônico LL-37 é o membro único da família da catelicidina humana, gerado pela clivagem do C-terminal externa da proteína, de 18-kDa, hCAP18 (Figura 8) nos queratinócitos pela proteases da família da calicreína e da proteinase 3 dos neutrófilos (SØRENSEN et al., 2016). Apresenta ainda a capacidade de se solubilizar entre duplas camadas lipídicas o que lhe confere proteção contra degradação proteolítica, diferentemente dos demais agentes antimicrobianos (OREN et al., 1999).

Figura 8. Clivagem da hCAP-18 e liberação de LL-37.

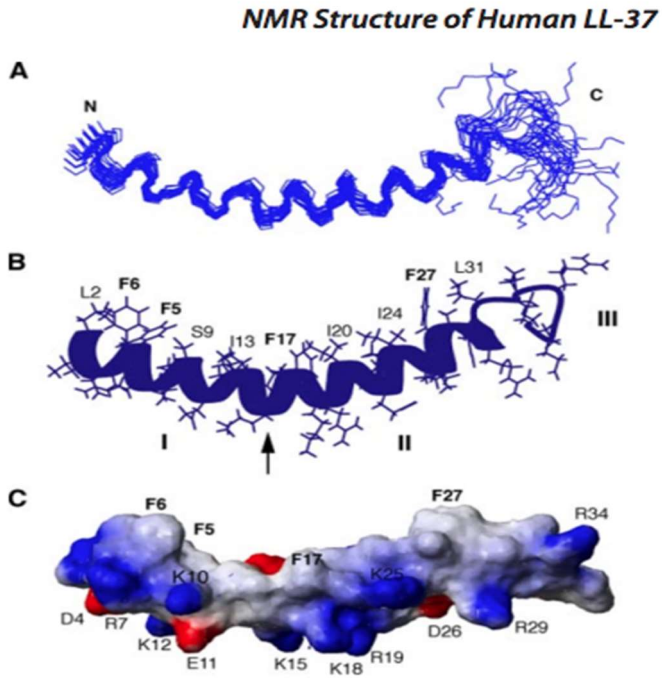


Fonte: Vitamin D3 modulates the innate immune response through regulation of the hCAP-18/LL-37 gene expression and cytokine production Daniel Svensson1 • Daniel Nebel1 • Bengt-Olof Nilsson1 Received

Além de sua bem estabelecida função antimicrobiana, estudos sugerem que a LL-37 tem um envolvimento complexo na rede de resposta imune e em doenças inflamatórias autoimunes (ZAIOU, 2007). Os níveis do peptídeo humano antimicrobial LL-37 são aumentados no LCR de indivíduos com meningite bacteriana, por ativação de astrócitos e micróglia, comparativamente a indivíduos saudáveis. A molécula homóloga em ratos está aumentada tanto *in vitro* como *in vivo* após estimulação bacteriana (BRANDENBURG et al., 2008).

LL-37, além de ser expressa em grânulos neutrofílicos, é produzida por macrófagos, células Natural Killer (NK), células epiteliais, vias aéreas, superfície ocular e intestinos. Sua expressão é regulada por vias inflamatórias bem como pela vitamina D que é assunto bastante estudado na Esclerose Múltipla pois é um relevante fator de risco (PARK et al., 2011). Sua carga positiva, catiônica, permite sua associação com a carga negativa, aniônica, dos fosfolipídeos de membrana, assumindo uma forma helicoidal, e durante esta interação permite a penetração transmembrana com formação de poros, responsáveis pela lise bacteriana (Figura 9) (BUCKI; JANMEY, 2006).

Figura 9. Caracterização da estrutura da LL-37. A) Estrutura molecular com 28 esqueletos de carbono; B) observar o formato helicoidal e C) Potencial superfície da LL-37 com as áreas em branco hidrofóbicas, resíduos ácidos em vermelho e básicos em azul.



Fonte: Wang, G. (2008). Structures of Human Host Defense Cathelicidin LL-37 and Its Smallest Antimicrobial Peptide KR-12 in Lipid Micelles. Journal of Biological Chemistry, 283(47)

2.4.1 LL-37, Vitamina D e Imunidade

Os raios ultravioletas (UVB) da luz solar convertem o 7-deidrocolesterol das camadas profundas do epitélio em pré-vitamina D3. As próprias células dendríticas expressam as hidroxilases para gerar a forma ativa 1,25 hidroxi-vitamina D3 que é transportada de forma livre ou dentro da própria célula apresentadora de antígeno, independente do ciclo já conhecido de passagens hepáticas e renais até a forma ativa. Nos linfonodos, a vitamina D ativa age nos receptores nucleares dos linfócitos T para expressão de CCR10 e de E-selectina para que seja efetuado o processo de *homing* (migração da circulação para o tecido alvo). A 1,25-hidroxi-vitamina D3 é um importante fator de transcrição para o gene do peptídeo antimicrobiano humano hCAP-18/LL-37 em uma grande variedade de células humanas. Essa rápida transformação em vitamina ativa, algo alternativo a via mais conhecida, é acelerada após ativação dos receptores de TLR (do inglês *Tool-Lie Receptor*), ou seja, após contato com

micro-organismos, ratificando os efeitos imunomodulatório da vitamina D, indo muito além do seu papel no metabolismo ósseo (SVENSSON; NEBEL; NILSSON, 2016).

Evidencias desse mecanismo imunomodulatório da LL-37 com a Vitamina D reside no fato de que o aumento desse AMP bloqueia as reações inflamatórias derivadas dos Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS's) com comprovada ação na periodontite contra a *Porphyromonas gingivalis* e contra a *Escherichia coli*, ou seja, os níveis de LL-37 estão aumentados em casos de gengivites de não fumantes (JÖNSSON; NILSSON, 2012) (INOMATA; INTO; MURAKAMI, 2010). Sobre a *P. gingivalis* especificamente, existem estudos nas quais a mesma induz a produção de IL-33, que age como inibidor da expressão da proteína hCAP18, podendo reduzir a produção de LL-37. Foi identificado que substâncias tóxicas produzidas por essas bactérias, conhecidas por *gingipains,* foram identificadas em cérebros de indivíduos com Alzheimer cujos níveis se relacionavam com a patologia da proteína tau e da ubiquitina. Desta forma, a *P. gingivalis* emergiu como um fator de risco para o desenvolvimento do Alzheimer esporádico. Em ratos, provou-se um aumento da produção da proteína A-beta1-42, um componente da placa amilóide, e que a *gingipain* era neurotóxica *in vivo* e *in vitro* (DOMINY et al., 2019).

Outras evidências apontam que o estímulo da 1,25 hidroxi-vitamina D3 é crítico para a indução do gene hCAP-18/LL-37 no combate ao *M. tuberculosis.* Estudos são bastante assertivos quanto ao fato de que o aumento da expressão do gene da LL-37 é dependente de receptores de Vitamina D3 na forma ativa (LIU et al., 2007).

2.4.2 Imunomodulação, Receptor de Vitamina D e LL-37

Muitos microrganismos podem alentecer a defesa inata pela desregulação dos receptores de Vitamina D (RVD), de modo a impedir a ativação dos genes de peptídeos antimicrobianos (catelicidina) que possuem poderosa atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica. Assim sendo, qualquer invasor que consiga desregular a expressão do RVD aumentará suas chances de sobrevivência (PROAL; ALBERT; MARSHALL, 2013). Estudos *in vitro* com vírus Epstein-Baar (EBV) demonstraram sua capacidade de reduzir a expressão dos RVD's em linfócitos B, implicando o vírus como fator de risco ainda a ser esclarecido na EM (PAVAN et al., 2010).

O *Micobacterium leprae* também é capaz de inibir a atividade do RVD em monócitos, assim como o *M. tuberculosis* e o *Aspergillus fumigatus* em macrófagos (COUGHLAN et al., 2012). Tal estratégia, permite aos patógenos acumularem-se no sangue ou nos tecidos do paciente para, paulatinamente, enfraquecerem o sistema imune inato, posto que, a inibição dos

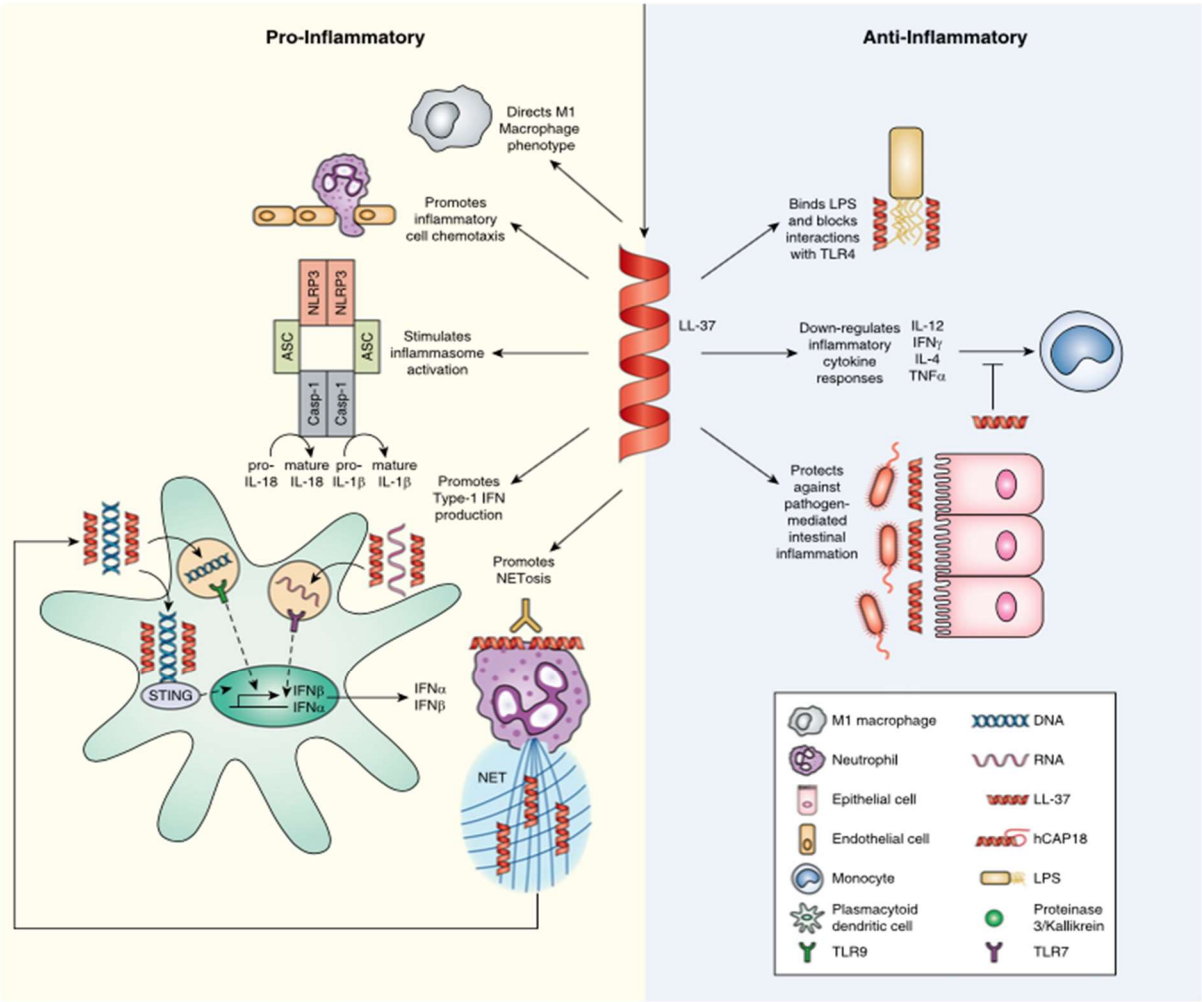
RVD leva à redução da diferenciação dos linfócitos em linhagem regulatórias, prevalecendo as linhagens agressivas, gerando ou potencializando as doenças autoimunes (LIU et al., 2012).

As funções imunomoduladoras da LL-37 vão depender do microambiente e dos mecanismos de base da enfermidade (Figura 10), de modo que esta molécula pode ser tanto reguladora quanto pro-inflamatória. A diferenciação dos monócitos em macrófagos (VAN DER DOES et al., 2010), por exemplo, pode ser afetada pela concentração de LL-37 e consequentemente, interferir na produção das citocinas inflamatórias com inibição da expressão da IL-10, que exerce efeito regulador, e aumenta a expressão da IL-1γ que exerce efeito inflamatório (YU et al., 2007). Um dos mecanismo anti-inflamatórios já descritos é a capacidade da LL-37 em aderir as lipoproteínas ou a demais produtos bacterianos para impedir a estimulação imune de macrófagos que desencadeiam processos inflamatórios (SCOTT et al., 2002).

2.4.3 LL-37 e o Fumo

O fumo é um fator de risco importante para Artrite Reumatoide (AR), aumentando a citrulinação das proteínas, inclusive da LL-37 que aumenta ainda mais suas propriedades quimiotáticas no recrutamente de macrófagos, com consequente aumento de citocinas inflamatórias (KILSGÅRD et al., 2012). Curiosamente, o tabagismo é um grande fator de risco para o desenvolvimento de Esclerose Múltipla. Estudos em paciente com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) também relacionam o aumento de expressão de LL-37, pelo estímulo do fumo, com a liberação secundária de citocinas quimioatrativas e que estimulam macrófagos a liberar mais citocinas (SCOTT et al., 2002).

Figura 10. Perfil de atividade da LL-37 e sua função imunomodulatória. LL-37 adquire numerosas funções imunomodulatórias a depender do ambiente e do contexto celular. Exposição a LL-37 resulta no recrutamento de células inflamatórias, indução de macrófagos e ativação de inflamossomas via I INF. LL-37 também é expressa na superfície dos neutrófilos e, na presença do autoanticorpo Anti-LL-37, ocorre NETose gerando uma fonte adicional de complexos de DNA com LL-37. Entretanto, LL-37 também possui forte efeito anti-inflamatório ao neutralizar a ativação do TLR4 pelo LPS bacteriano, regulação com respostas de citocinas inflamatórias e impedindo invasão e resposta inflamatórias de bactérias patogênicas, especialmente nas criptas das vilosidades intestinais.

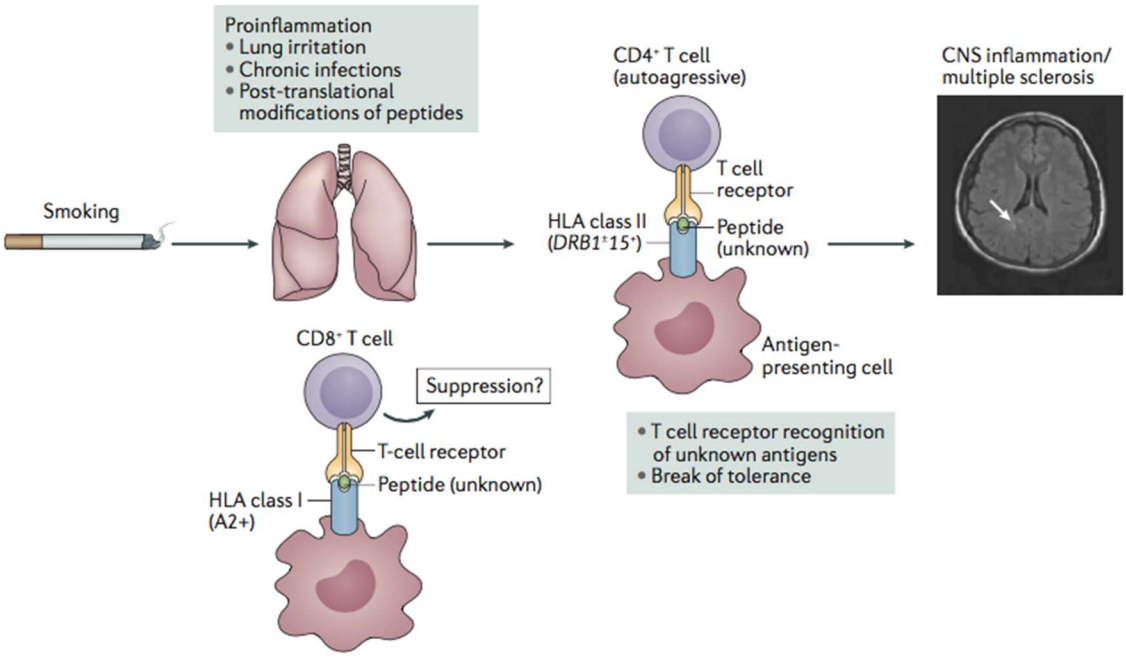


Fonte: Kahlenberg, J. M., & Kaplan, M. J. (2013). Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. The Journal of Immunology, 191(10), 4895–4901.

Tal processo leva a remodelação do epitélio e a inflamação crônica, tendo em vista que as lipoproteínas da colonização bacteriana secundária, no tecido pulmonar deformado, induz novamente a expressão de LL-37, gerando um ciclo de inflamação crônica (JIANG et al., 2012).

Existem ainda hipóteses sobre o mecanismo de ação pelo qual o fumo pudesse estimular linfócitos respondedores de antígenos do SNC a invadir o mesmo e provocar lesões desmielinizantes (Figura 11) (OLSSON; BARCELLOS; ALFREDSSON, 2016)

Figura 11. Mecanismo hipotético pelo qual o fumo contribui como risco na Esclerose Múltipla. A ativação de vias inflamatórias e alterações pós translacionais em peptídeos podem levar a ativação de células T residentes autoimune CD4+ antígeno específico para o SNC



Fonte: Olsson, T., Barcellos, L. F., & Alfredsson, L. (2016). Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. Nature Reviews Neurology, 13(1), 25–36.

2.4.4 LL-37 e Demais Doenças Autoimunes

Nas doenças autoimunes, como por exemplo, na psoríase ocorre uma grande expressão de LL-37 nos queratinócitos com grande efeito anti-apoptótico nessas células, contribuindo assim para a expressão clínica da doença, como a proliferação celular exacerbada (CHAMORRO et al., 2009).

No Lúpus Eritematoso Sistêmico, a via da IL-1γ tem relação com a enfermidade e a severidade desta doença (ELKON; SANTER, 2012), uma vez que a ativação de inflamossomas em resposta ao LL-37, em macrófagos destes pacientes, leva à alteração na produção de citocinas inflamatórias e se relaciona com a atividade da doença e com exacerbações graves (KAHLENBERG et al., 2013).

Há evidências da participação direta da LL-37 também na Artrite Reumatoide (RA) com aumento de expressão da própria molécula e das proteases envolvidas detectados no líquido sinovial (PAULSEN et al., 2002).

2.4.5 Resposta das células da Glia e Astrócitos a LL-37

Dados sugerem que a expressão de LL-37 tem grande papel em doenças neurológicas mediadas por neuroinflamação, e talvez seja um dos principais componentes na progressão dessas doenças.

Os tecidos humanos rotineiramente expressam a proteína hCAP-18, que é basalmente um pouco mais elevada no trato gastrointestinal e no cérebro, provavelmente refletindo uma função basal que permita uma rápida resposta a fatores patogênicos. Além disso, conforme já afirmamos, há evidências de que a LL-37 desempenha papel muito mais relevante como molécula sinalizadora do sistema imune inato do que apenas um antibiótico natural (LEE et al., 2015). Neuroinflamação é mantida pela ativação de micróglia, astrócitos e citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas bem como de outras moléculas potencialmente tóxicas para o SNC, além disso, esse estado neuropatológico resulta em neurodegeneração. Tal processo já é bem descrito na Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e na Esclerose Lateral Amiotrófica, entretanto a Esclerose Múltipla oferece também um modelo a ser melhor compreendido de enfermidade com eventos inflamatórios, inclusive agudos (fase EMSR) e fases neurodegenerativas (EMSP ou EMPP) (MCGEER; MCGEER, 2002) (WHITTON, 2007).

Em culturas de astrócitos e de micróglia, foi observado que o LL-37 induzia a liberação de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas por ativação das vias inflamatórias intracelulares com estímulo do NF-kb, IL-10 e de IL-6 (VAN WAGONER; BENVENISTE, 1999) (BRANDENBURG et al., 2010) (LEE et al., 2015).

2.4.6 Resposta imunológica associada de Interferons a LL-37

O aumento da expressão da LL-37 também leva ao aumento da expressão do antiviral Interferon beta (INFγ) nos queratinócitos e foi comprovada *in vitro* que a atividade antimicrobiana e imunomodulatória ocorre com mais eficácia na presença concomitante desses dois elementos do que na presença do peptídeo LL-37 isolado (TAKIGUCHI et al., 2014).

Estudos com pacientes lúpicos, ou com polimiosite e dermatopolimiosite, comprovam a associação entre LL-37 e o sistema de Interferons como perpetuadores da resposte imunológica. Neste caso, a exposição continuada aos Interferons poderia levar a perda da tolerância imunológico e ao desenvolvimento destas enfermidades (LU et al., 2016)

3 MÉTODOLOGIA

3.1 População de Estudo

O presente estudo de coorte transversal, realizado com 32 pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da UFPE, com idades entre os 18 e 57 anos, diagnosticadas com Esclerose Múltipla e um total de 25 indivíduos sadios foram incluídos na pesquisa, com coleta de sangue periférico nas mesmas condições citadas para os pacientes. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco - Plataforma Brasil (Ministério da Saúde) CAAE: 47869315 0 00005208 (anexo 1). Fatores como tabagismo, níveis de vitamina D, histórico clínico e familiar foram coletados em questionário (anexo 2), aplicado após concordância do paciente. Os dados clínicos foram coletados do prontuário das pacientes.

3.2 Coleta de Amostras

As amostras de sangue periférico foram coletadas após a concordância do paciente em participar da pesquisa. Para a coleta foram utilizados tubos de 4mL K3 EDTA (BD Vacuette®) contendo 2mL de RNA*later* (ThermoFisher Scientific, USA) para preservar o RNA. As amostras foram transportadas em caixa refrigerada e, após a chegada no laboratório, foram fracionadas em tubos de polipropileno e armazenadas no freezer à -80°C.

3.3 Extração de RNA

A extração do RNA de sangue total foi feita utilizando o kit Maxwell® 16 System LEV SimplyRNA Blood (Promega, USA), com adaptação no volume da amostra utilizada. A primeira etapa consistiu da adição de 1 (um) mL de amostra de sangue e 3 (três) mL de *Cell Lysis Solution,* em uma proporção de um para três, para que ocorresse a lise da membrana celular e liberação dos componentes intracelulares. A mistura ficou em repouso por 10 minutos (para ocorrer a quebra dos componentes da membrana) e em seguida foi centrifugada por 10 minutos a 3000 x*g* para visualização do *pellet* dos componentes liberados. Após o processo, o sobrenadante foi desprezado e foi, então, adicionado 200□L de solução preparada com *Homogenization Solution* e *1-Thioglicerol (*essa solução é preparada com 20□L de 1-Thioglicerol a cada 1mL de *Homogenization Solution*), tendo esta etapa a função de auxiliar

em processos contra o estresse oxidativo das células. Posteriormente, houve a homogenização da amostra com o auxílio do LabDancer vórtex (IKA) e em seguida a adição de 200□L de *Lysis Buffer,* para lisar o núcleo, e 25□L de Proteinase K*,* para degradação de proteínas. Por fim, uma nova homogeneização foi realizada com o auxílio do vortex LabDancer (IKA) e então, iniciou-se o preparo do Maxwell® 16 System (Promega, USA). Os cartuchos disponibilizados no kit contêm 8 poços, sendo o poço 1 utilizado para armazenar a amostra pré-preparada, com volume máximo de 500□L. Ao poço 4 é adicionado a solução DNAse, responsável pela degradação do DNA e ao poço 8 são adicionados os *plungers*, estruturas plásticas que são utilizadas recobrindo o pistão metálico e permitindo tanto a homogeneização da amostra com os reagentes de cada poço assim como o acoplamento das perolas magnéticas que compõem o kit e são responsáveis por captar o RNA que é liberado ao longo do processo. Esse processo de purificação da amostra tem duração de 40 minutos, sendo finalizado com a etapa de eluição do o RNA coletado nas perolas magnéticas em 50 mL de solução de *Nuclease Free Water.*

Após a extração, todas as amostras foram quantificadas pelo Espectrofotômetro NanoDrop® – 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para verificação da purificação da extração. As amostras de RNA ficaram armazenadas à -80°C até a realização a realização da síntese de cDNA.

3.4 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado utilizando o Kit *QuantiNova® Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Para o preparo da reação foram utilizados 1μL de *gDNA removal* e 6,5μL de amostra de RNA para eliminação de resquícios de DNA. Após a mistura dos reagentes, o tubo foi incubado por 2 minutos à 45°C no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, 0,5 μL da enzima transcriptase reversa e 2 mL do *Mix* foram adicionados ao foram adicionados aos tubos tubo, tendo um volume final de 10 μL. Para finalizar, os tubos foram incubados por 3 minutos à 25°C para anelamento do *primer*, seguido de uma segunda incubação por 10 minutos à 45°C para síntese, e uma terceira incubação por 5 minutos à 85ºC para inativação.

As amostras de cDNA foram quantificadas pelo Espectrofotômetro NanoDrop® – 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para verificação da concentração do cDNA obtido. As amostras ficaram armazenadas à -80°C até a realização da qPCR.

3.5 Análise de expressão gênica

A análise por PCR em tempo real foi realizada no equipamento StepOne Plus™ (Applied Biosystems). Os *primers* do gene LL37 (SCHRUMPF et al., 2012) (ADA et al., 2017) e do gene de referência γ-actina (*Fw*: 5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3' e *Rv*: 5'-GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT-3') foram sintetizados pela Exxtend (https://www.exxtend.com.br), a partir das sequências fornecidas. Para a análise do gene de referência β-actina, foi utilizado o volume final da reação de 10μL: 5μL de SYBR, 0,1μL do *primer forward* e 0,1μL do *primer reverse*, 0,1μL de CXR, 3,7μL de água e 1μL de cDNA (100ng). Os *primers IL18* (Hs.PT.58.25675872), *IL6* (Hs.PT.58.40226675), *IL10* (Hs.PT.58.2807216), *INFB1* (Hs.PT.58.39481063.g) utilizados para análise de qPCR foram selecionados na plataforma da Integrated DNA Technologies (https://www.idtdna.com/pages). Para a reação de qPCR dos genes alvo foi utilizado o kit SyBr® Green Master Mix (Promega, USA) com volume final da reação de10μL, contendo: 5μL de SYBR, 0,1μL do *primer*, 0,1μL de CXR (Carboxy-X-Rhodamine), 3,8μL de água e 1μL de cDNA (100ng). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial 95 °C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 3 segundos, 60°C por 30 segundos. A curva de *melting* foi realizada no final da reação em um estágio de 60-95°C. As curvas de dissociação foram geradas para avaliar a qualidade da reação através da garantia de que apenas um produto foi amplificado (*melting curve*). A expressão gênica foi analisada através dos valores de ΔCt ($Ct_{\text{gene-alvo}} - Ct_{\beta\text{-actina}}$), no qual valores mais altos indicam menor expressão gênica.

3.6 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste exato de Fisher foi utilizado para dados categóricos e, Mann-Whitney foi utilizado para dados numéricos. O nível de significância de todos os testes foi definido em $p<0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Caraterização dos Pacientes

No presente estudo, um total de 25 indivíduos controles e 31 pacientes, que são acompanhados no ambulatório de doença desmielinizantes do Hospital das Clínicas da UFPE, foram incluídos na análise. Os pacientes com Espectro de Neuromielite Óptica, confirmadas ou não pela positividade ao Anticorpo Antiaquaporina 4, foram excluídos neste estudo. Apenas um paciente permaneceu como CIS e foi, também, excluído. Durante o processo foram excluídos indivíduos que não apresentaram viabilidade das amostras de sangue (seja na etapa de extração de RNA, seja na etapa de quantificação dos genes-alvo), ou dificuldade de obtenção dos dados clínicos corretos.

Em relação ao grupo controle, havia 25 amostras de indivíduos com idades entre 21 e 61 anos, com média entre 30 e 40 anos.

Os pacientes são todos avaliados periodicamente pela Escala Expandida de Incapacidade (EDSS do inglês Expanded Disability Status Scale, ANEXO I) que é a forma mais aproximada de avaliar os sistemas funcionais neurológicos acometidos.

EDSS variou de 0 (paciente sem incapacidade) até 6,5. Considera-se o EDSS acima de 4 como moderada incapacidade, enquanto acima de 7 torna-se grave uma vez que ao alcançar 7,5 o paciente torna-se cadeirante. A maioria dos pacientes apresentava EDSS entre 0 - 1,5 e, à época da coleta, utilizava como medicações as Interferonas e o Acetato de Glatiramer, considerados pelas recomendações do *Brazilian Commitee for Treatment and Reasearch in Multiple Sclerosis* (BCTRIMS) como medicamento considerados de baixa potência, porém de primeira escolha/linha pelas diretrizes técnicas do Governo Federal do Brasil. Ressalte-se que na prática clínica, observa-se excelente resposta ao INFγ 44mcg três vezes na semana, sendo o mesmo utilizado em casos mais leves apesar da interpretação médica de possível doença mais agressiva.

De forma geral, os pacientes realizam reposição de vitamina D, pois o BCTRIMS recomenda alcançar níveis entre 40 e 50ng/ml como patamares mais seguros para pacientes com doença desmielinizante. A maioria dos pacientes chega, em sua primeira avaliação dos resultados laboratoriais, com níveis de insuficiência para a dosagem de 25-hidroxi-vitamina D3, cujos valores de referências seriam níveis suficientes acima de 30ng/ml. De forma que, muito raramente, os pacientes apresentam níveis alarmantes desta vitamina, pois a reposição é reavaliada a cada 3 ou 6 meses para impedir níveis tóxicos com complicações renais e disfunções motoras, decorrentes do metabolismo do cálcio. No entanto, observa-se o fenômeno

oposto, no qual, por maior que seja a reposição muitos pacientes seguem com valores séricos insuficientes ou mesmo com uma elevação muita lenta destes níveis. Adicionalmente, alguns indivíduos não conseguem seguir as orientações médicas de suplementação de Vitamina D de forma correta, seja por questões financeiras ou pelo baixo índice educacional da maioria dos indivíduos atendidos no sistema público de saúde. Os indivíduos saudáveis (grupo controle), por sua vez, em sua totalidade, nunca realizaram nenhuma avaliação dos níveis séricos de vitamina D, apenas um indivíduo repunha de forma empírica, sem prescrição médica.

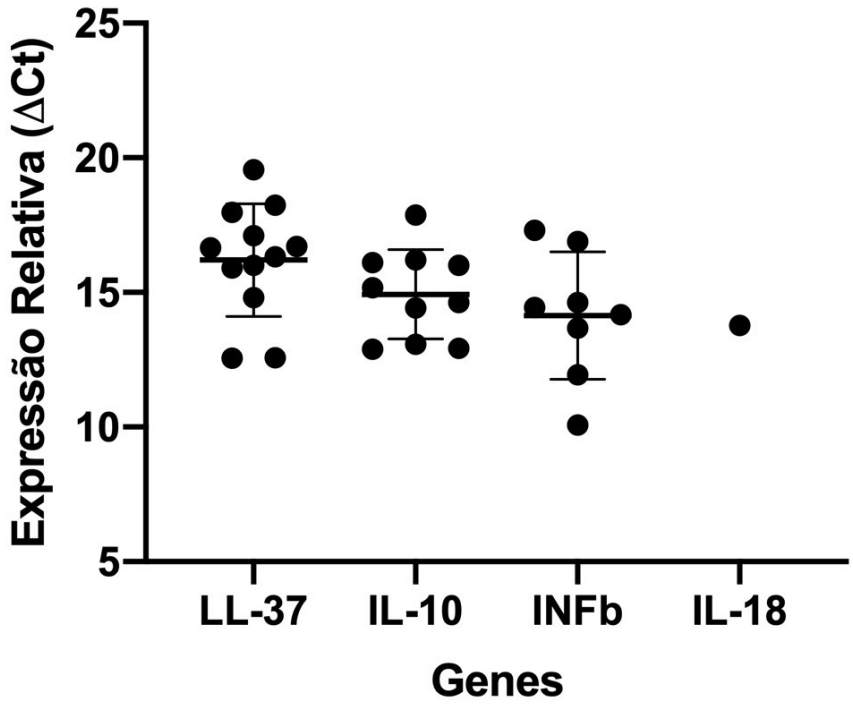
Com exceção dos pacientes *naive* (termo amplamente adotado e utilizado nos trabalhos científicos para EM, que eram considerados virgens de tratamento) a época da coleta, os pacientes recebem medicações autorizadas pelo Sistema Único da Saúde (SUS), através do setor de Medicamentos de Alto Custo que disponibilizavam, no período da extração das amostras, as Interferonas, o Acetato de Glatiramer, o Fingolimode e o Natalizumabe. Em 2019, foi incorporado o Dimetil-Fumarato e a Teriflunomida. Alguns raros pacientes fazem uso de amostras originais da medicação, supridos pelas próprias empresas, em casos de falta de abastecimento do Governo Federal ou na iminência da liberação da medicação após incorporação pelo SUS, como é o caso do Dimetil-Fumarato.

4.2 Expressão de LL-37 e citocinas

A análise da Tabela 3 revela um perfil de 22 pacientes com idades desde os 18 anos até os 57 anos com apenas três pacientes homens guardando uma proporção de aproximadamente 6,5:1 para preponderância do sexo feminino. Os pacientes que expressaram qualquer positividade para LL-37, IL-10 ou INFγ foram agrupados para análise das variantes clínicas e laboratoriais, além de serem associadas a dados clínicos de *follow up* desde o período da coleta, entre abril e agosto, retomando as duas últimas pacientes em novembro e dezembro cada uma, até fevereiro de 2019. A princípio, formavam um grupo bastante heterogêneo, sendo necessário a avaliação individual da evolução de suas formas de doença. Nenhum dos pacientes apresentaram expressão da IL-6, e apenas um paciente apresentou expressão para IL-18. Desta forma, estes dois genes não foram considerados relevante na análise final.

Sobre os níveis de expressão dos genes LL-37, IL-10 e INFγ em pacientes com Esclerose Múltipla, Gráfico 1, observamos que o aumento de expressão de LL-37 foi a mais baixa dentre os três genes avaliados, enquanto os níveis de expressão de INFγ foram, em média, os mais altos dentro deste subgrupo de pacientes. Nenhum paciente apresentou expressão para IL-6 e apenas um paciente apresentou expressão para IL-18, conforme já relatado.

Figura 12. Expressão dos genes LL-37, IL-10, INFγ e IL-18



A ausência de expressão dos genes no grupo de indivíduos saudáveis, ou mesmo a falta de representatividade por ocorrem em indivíduos isolados, demonstra que estas moléculas estão relacionadas ao processo inflamatório inerente à esclerose múltipla. Com exceção de uma única amostra do sexo feminino, de 30 anos de idade e sem nenhuma comorbidade ou história de outra doença autoimune prévia, nem historia familiar para doenças da autoimunidade, que apresentou expressão gênica aumentada apenas para LL-37, todos os demais 24 indivíduos controles não expressaram nenhum dos três genes testados (LL-37, IL-10 ou INFγ). O perfil destes era de indivíduos majoritariamente hígidos e que não faziam uso de antibióticos no momento da coleta ou mesmo de qualquer droga com efeito imunossupressor.

Tabela 3. Lista de pacientes analisados com seus respectivos dados clínicos e positividade para expressão de LL-37, IL-10 e INFβ.

Paciente	Sexo	Idade	EDSS	DMD	Vit. D	Fumo	Diagnóstico	LL-37	IL-10	INFγ	DMD (tempo de uso)
P1	F	54	1,5	INFγ1A 30	<30	+	EMSR	+	-	-	<3 meses
P2	F	48	1	INFγ1A 44	>30[a]	-	EMSR	-	-	+	>3 meses
P3	F	57	1	INFγ1A 44	<30	-	EMSR[b]	+	+	-	<3 meses
P4	F	24	1	Acetato de Glatiramer	<30	-	EMSR[c]	+	-	-	<3 meses[c2]
P5	F	41	0	INFγ1A 44	<30	-	EMSR	-	-	+	<3 meses
P6	F	35	4	Fingolimode	>30	-	EMSR**[,d]	+	+	-	>3 meses
P7	F	20	1	INFγ1A 30	<30	-	EMSR*[,e]	+	-	-	>3 meses
P8	F	56	6,5	Acetato de Glatiramer[f]	<30	-	EMSP[f2]	-	+	+	>3 meses
P9	F	55	5	Acetato de Glatiramer[f]	>30	-	EMSR**	-	+	+	>3 meses
P10	M	36	1,5	Fingolimode	>30[h]	-	EMSR[h2]	+	+	-	>3 meses
P11	F	43	1,5	Fingolimode	<30	-	EMSR**	-	-	+	>3 meses
P12	M	25	6	*naive*[i]	<30	-	EMSR	-	+	+	-
P13	M	34	1,5	Acetato de Glatiramer	<30	-	EMSR	-	-	+	>3 meses
P14	F	21	1	INFγ1A 44	<30	-	EMSR	-	+	-	<3 meses
P15	F	39	2	Acetato de Glatiramer	<30	-	EMSR	+	-	-	<3 meses
P16	F	18	1,5	*naive*[j]	<30	-	EMSR[j2]	+	+	+	-
P17	F	19	0	INFγ1A 30	<30	-	EMSR	+	-	-	<3 meses
P18	F	18	4[k]	INFγ1A 30	<30	-	EMSR	-	+	-	<3 meses
P19	F	44	1	*naive*[l]	<30	-	EMSR	+	+	-	-
P20	F	28	0	Teriflunomida	>30	-	EMSR	-	+	-	<3 meses
P21	F	25	1	*naive*[m]	<30	-	EMSR	+	-	-	-
P22	F	22	2,5	Dimetil-fumarato	<30	-	EMSR	+	-	-	<3 meses

DMD: Droga Modificadora da Doença; F: Feminino; M: Masculino; < ou > que 30ng/ml de Vitamina D; INFb1A 30: Interferon beta 1 A 30mcg semanal; INFγ1A 44: Interferon beta 1^A 44mcg 3 vezes na semana; RADIO: Radiológica; *Naive*: virgem de tratamento. *Falha radiológica; **Falha clínica e radiológica; [a]Fazia reposição antes do diagnóstico; [b]Colheu amostras com <3 meses de uso da medicação, porém segue estável sem progressão clínica ou radiológica; [c]Apresentou infecção crônica de tecido mamário, estável no período da coleta e teve discreta progressão radiológica sem progressão clínica, [c2]Havia feito uso irregular por suspeita de gestação; [d]Progrediu para EDSS 7,5, cognição afetada; [e]Paciente com diagnóstico desde criança de doença celíaca, evoluiu com falha e troca para Fingolimode, estável desde a mudança em agosto/2018; [f]Aceitou apenas Glatiramer como terapia, faz pulsos *off label* de Imunoglobulina Humana e refere melhora, [f2]Abandonou acompanhamento na fase

de surtos e retornou cadeirante já em fase secundariamente progressiva; [g]Migrou para natalizumabe; [h]Repunha previamente pois exames de 2017 com Vit D 25,1 ng/ml, [h2]Diagnosticado já com extensa carga de lesão medular e encefálica; [i]Programação para Natalizumabe pelo quadro avançado; [j]Programada Natalizumabe à época, já em uso desde janeiro/2019, [j2]Diagnosticada com muita carga lesional, lesões em atividade; [k]Baixíssima carga lesional, porém perda grave visual no único surto; [l]Programado INFγ1A 44; [m]Iniciado posteriormente INFγ1A 44.

Quatro pacientes eram considerados *naive,* à época da coleta. Três pacientes utilizavam Fingolimode, além de um paciente que utilizavam Dimetil-Fumarato. Ambas as drogas são consideradas pelo BCTRIMS como possuidoras de potência moderada. Apenas um paciente fazia uso de Teriflunomida, reservado a casos menos agressivos e considerada pelo BCTRIMS como medicação de baixa potência. As coletas foram iniciadas em abril de 2018 e finalizadas em dezembro de 2018, conforme citado. Foi possível resgatar os dados clínicos em prontuário no sentido de compreender quais pacientes apresentaram uma evolução desfavorável frente a medicação escolhida.

Foi preciso realizar algumas trocas das primeiras escolhas de medicações para outras de potências maiores e esse é um fato relevante para compreender que a atividade de doença seguia ativa mesmo em alguns pacientes tratados. Retrospectivamente, ocorreram falhas importantes do ponto de vista clínico e radiológico com progressão de EDSS, levando a escolha terapêutica recair sobre o anticorpo monoclonal Natalizumabe, um anticorpo anti-integrina alfa 4 dos linfócitos, considerado de altíssima eficácia, a despeito da inconveniência, para o paciente, da monitorização laboratorial contínua e dos potenciais efeitos colaterais.

Dos 22 pacientes apenas quatro apresentavam níveis superiores ao nível mínimo de suficiência de vitamina D (25-hidroxi-vitamina D3), que seria acima de 30ng/ml, enquanto os 18 pacientes restante estavam todos em nível de insuficiência. Todos os grupos repõem vitamina D, conforme orientação do BCTRIMS. Apenas uma paciente apresentava fumo ativo, e continua a ser tabagista, desde a coleta em abril/2018, a despeito de todas as orientações médicas e tratamentos oferecidos para deixar a dependência física e psicológica do fumo.

Dos paciente coletados a partir de abril/2018 até agosto/2018, quatro deles apresentaram evolução clínica e/ou radiológica desfavorável. As pacientes P21 e P22 foram recrutadas para o estudo em novembro e dezembro, respectivamente e foram reavaliadas inúmeras vezes desde janeiro/2019, apresentando-se estáveis apesar de P21 ter evoluído com novo surto em vigência de um mês de medicação, porém o evento clínico apresentado foi brando (leve nistagmo central) com recuperação plena do status funcional anterior.

Todos os pacientes com expressão gênica para LL-37, IL-10 ou INFγ, foram classificados pelos critérios revisados de McDonald 2017 como portadores de Esclerose

Múltipla forma Surto Remissão (EMSR ou EMRR) com exceção de P8, que se comporta há três anos como forma EM Secundariamente Progressiva. A paciente P1, tabagista, apresentou níveis aumentados da expressão da LL-37. Dentre os 22 pacientes, outros onze também apresentaram expressão aumentada para esta mesma molécula. Do total de 12 pacientes com expressão aumentada para LL-37, nove deles haviam iniciado suas terapias há menos de 3 meses, enquanto que outros três pacientes, a despeito do uso de medicação há mais de 3 meses, também foram positivos para a expressão aumentada. Dentre este subgrupo de expressão aumentada para LL-37 e mais de 3 meses de uso de medicação é preciso observar que P6 e P10 apresentam alta carga lesional (encéfalo e medula bastante acometidos), a despeito de P10 ter um EDSS de 1. Ambos os pacientes também positivaram para IL-10, mas ressaltamos que P6 apresenta já grave comprometimento cognitivo, e não foi migrada para medicações de altíssima potência pela impossibilidade da própria paciente e de seus familiares manejarem os cuidados terapêuticos e a monitorização de efeitos colaterais graves. A P7, portadora de doença celíaca controlada no momento do exame, evoluiu com EDSS estável e sem progressão, entretanto apresentou importante falha radiológica (progressão de imagens captantes de contraste e novas lesões que não haviam em controles anteriores), de modo que a paciente migrou para uso de Fingolimode, assim como P6 e P10.

Dentre os quatro pacientes *naive*, apenas o P12 não expressou LL-37. Este paciente já apresentava queixas há anos, chegando ao serviço com EDDS 6 (marcha extremamente comprometida, ataxia global e sinais clínicos de acometimento importante do tronco encefálico como nistagmo espontânea, assimetrias faciais, dormências em território de face), mas sem surto clínico no momento do atendimento.

Sobre os demais pacientes que foram positivos para IL-10 e INFγ□□e negativos quanto a expressão de LL-37, identificamos que: P2 evolui de forma totalmente favorável, já fazia uso de interferonas e segue sem falhas terapêuticas; P5 também segue estável em uso de interferonas e sem falhas terapêuticas; P13 se manteve estável por muito tempo, até que, recentemente, apresentou novo surto clínico importante, com sinais de tronco, porém retornou ao EDSS anterior; P14 segue estável e sem falhas terapêuticas; P18 também segue estável, a despeito do EDSS elevado pois no único surto apresentou perda visual monocular grave, entretanto é totalmente funcional do ponto de vista motor e segue sem falhas terapêuticas; e a P20 segue em EDSS de 0, sem apresentar novas falhas desde o seu primeiro surto. A paciente P8 tem um comprometimento avançado, com EDSS 6,5 e apresenta-se há mais de 3 anos sem surtos e com discreta piora progressiva das incapacidades, sem alterar o EDSS. A paciente P9 atravessou um período de grande estabilidade, porém recentemente apresentou falha clínica e

radiológica, sendo migrada para uso de Natalizumabe. A paciente P11 apresentou, a despeito de utilizar medicação de moderada potência, falha clínica e radiológica, e também iniciou o Natalizumabe. Com exceção dos pacientes P8, P9, P11 e P12 (um paciente *naive*), os demais seis pacientes, que não apresentaram positividade para expressão de LL-37 parecem apresentar um curso mais brando da enfermidade.

Onze pacientes apresentaram expressão gênica para IL-10 aumentada, sendo expressa em três dos quatro pacientes que apresentaram falha terapêutica. Apenas os pacientes P6, P9 e P10 apresentavam IL-10 e níveis acima da suficiência para vitamina D, sendo eles pacientes que realizavam suplementação em doses altas há mais de 6 meses. Os outros oito pacientes com expressão gênica aumentada para IL-10 apresentavam níveis insuficientes de vitamina D no momento da coleta. Dentre os pacientes com expressão aumentada para IL-10, não foi possível observar uma sólida relação com maiores níveis de vitamina D, conforme literatura.

Os pacientes que apresentaram aumento isolado na expressão gênica do INFγ podem ser considerados estáveis na evolução clínica, apenas P11 apresentou evolução desfavorável mesmo estando em uso de Fingolimode, DMD de alta eficácia, precisando migrar para Natalizumabe em janeiro/2019.

Do total de 22 pacientes com expressões aumentadas, nove apresentaram aumento concomitante para mais de um gene analisado. P16, uma paciente bastante jovem, apresentou aumento de expressão gênica para todos os genes analisado, com altíssima carga lesional em exames de imagem ao diagnóstico, já sendo indicado o uso de terapia de altíssima eficácia com anticorpo monoclonal Natalizumabe, seguindo as diretrizes do BCTRIMS. Ocorreu aumento concomitante de LL-37 e IL-10 em 5 pacientes, e excetuando-se a P16 (positiva para os 3 genes testado), não ocorreu concomitância da positividade para LL-37 e INFγ.

Após avaliar o histórico clínico dos pacientes com aumento de expressão gênica, para qualquer dos 3 genes e principalmente para LL-37 e IL-10, concomitante ou não, podemos inferir que:

a) os pacientes deste subgrupo eram *naive* e/ou recém saídos de fases inflamatórias da doença por surto clínico, ou apresentavam reduzido tempo de uso das DMD (menos de 3 meses) ou;

b) os pacientes que já faziam uso de suas DMD's há mais de 3 meses e apresentavam falha terapêutica, ou a própria atividade de base da doença era mais agressiva, o que levou a essa constatação das evoluções desfavoráveis de suas formas clínicas.

Apenas P4, em uso prologado de sua DMD, apresentou aumento de expressão da LL-37 isolada. A paciente, quando questionada, revelou que havia feito uso irregular, por conta própria, nos meses que antecederam à coleta, por suspeita de gravidez, sendo a mesma paciente que apresentou (durante meses antes da coleta) infecção crônica em tecido mamário secundária a procedimento cirúrgico. Entretanto, para inferir que este subgrupo tinha por característica principal a ausência de efetividade do tratamento, devido ao tempo reduzido de administração ou à presença de formas mais agressivas, seria preciso analisar o perfil clínico dos demais pacientes com Esclerose Múltipla cujas análises não apresentaram aumento algum para nenhuma das três moléculas testadas.

4.3 Pacientes em "silencio inflamatório"

Dentre todos os 31 pacientes avaliados para LL-37, IL-10 e INFβ apenas nove pacientes não apresentaram nenhuma expressão gênica (Tabela 4). Este subgrupo é composto de cinco mulheres e quatro homens, com idades entre 27 e 50 anos.

Tabela 4. Perfil clínico dos pacientes em uso de DMD que não expressaram LL-37, IL-10 ou INFβ.

Indivíduo	**Sexo**	**Idade**	**EDSS**	**DMD**	**Vit. D**	**Fumo**	**Diagnóstico**	**DMD (tempo de uso)**
P23	M	50	0	INFb1A 30	>30	-	EMSR	> 3 meses
P24	F	34	0	*naive*[a]	<30	-	EMSR	-
P25	F	36	0	Fingolimode	>30	+	EMSR	> 3 meses
P26	F	44	4[b]	Fingolimode	>30	-	EMSR	> 3 meses
P27	M	47	7	Acetato de Glatiramer	<30	-	EMPP com surto[c]	>3 meses
P28	M	32	7,5	Fingolimode	<30	-	EMSR→EMSP[c]	> 3 meses
P29	F	27	1	INFb 1A 44	<30	-	EMSR	> 3 meses
P30	M	44	4	Fingolimode	>30	-	EMSR→EMSP[c]	> 3 meses
P31	F	32	1	Acetato de Glatiramer	>30	-	EMSR	> 3meses

DMD: Droga Modificadora da Doença; F: Feminino; M: Masculino; < ou > que 30ng/ml de Vitamina D; INFb1A 30: Interferon beta 1 A 30mcg semanal; INFγ1A 44: Interferon beta 1^{A} 44mcg 3 vezes na semana; *Naive*: virgem de tratamento; EMSR→EMSP: paciente com mudança do comportamento da enfermidade da forma surto remissão para um padrão sem novos surtos com progressão da incapacidade na forma secundariamente progressiva.

[a]Segue atualmente em uso de interferona, estável, sem surtos clínicos ou evolução radiológica; [b]Após uso da DMD a paciente apresenta EDSS 1 e segue sem surtos ou evolução radiológica; [c]Paciente apresentava quadro compatível com EMPP, porém evoluiu sem surtos ou evidência radiológica de atividade de doença, aguarda autorização para uso de anticorpo monoclonal Anti-CD20 como única terapia disponível para as forma EMPP (Ocrelizumabe); [d]Mais de 3 anos sem surtos, progressão lenta, sem atividade radiológica de doença; e- último surto clínico há mais de 3 anos, piora lenta das incapacidades sem atividade clínica ou radiológica de atividade de doença.

Em relação ao EDSS, este subgrupo apresentava uma dicotomia entre os três pacientes com ausência de incapacidade, dois pacientes com EDSS de 1 e quatro pacientes com EDSS moderado a elevado (dois pacientes com EDSS de 4, um com EDSS de 7, e outro com EDSS de 7,5). Entretanto, o EDSS elevado desses pacientes não se refletiu em maior agressividade da doença do ponto de vista de surtos inflamatórios. Dentre os nove pacientes, cinco apresentavam níveis de suficiência de vitamina D, e apenas o P25 era fumante ativo.

Os pacientes que não apresentaram expressão de LL-37, IL-10 e INFb utilizam desde Interferon, Acetato de Glatiramer até Fingolimode, sem descrição de falha terapêutica. Vale ressaltar que, o P24 era *naive* de tratamento à época da coleta. Adicionalmente, o P27 deverá ter sua medicação modificada devido ao lançamento comercial da primeira droga direcionada para forma Primariamente Progressiva (EMPP). Os P28 e P29 pararam de apresentar surtos clínicos há mais de 3 anos, evoluindo lentamente com progressão de suas incapacidades e habilidades motoras (porém sem piora sensível ao EDSS), podendo ser considerados como portadores de Esclerose Múltipla forma Secundariamente Progressiva.

Neste subgrupo parece haver uma espécie de "silêncio inflamatório" para as moléculas testadas, no qual a atividade aguda da doença não é possível mensurar/perceber no aspecto clínico, ou nas características radiológicas. Após avaliação dos dados podemos inferir que:

a) neste subgrupo, os pacientes seguem evoluindo com excelente prognóstico, respondendo ao uso da medicação escolhida ou;
b) eram pacientes em fases avançadas da doença, porém sem o componente inflamatório agudo.

Não foi possível a realização de testes de sorologia para EBV dos pacientes estudados, uma vez que este não é um exame incluído na rotina de investigação. Deste modo, não foi possível fazer qualquer tipo de avaliação entre a relação desta infecção viral, quadros desmielinizantes ou expressão de LL-37, IL-10 e INFb. A associação entre fumo, doenças

desmielinizantes e LL-37 também não pode ser avaliada pois não é o perfil da população estudada manter hábitos como tabagismo.

5 DISCUSSÃO

O papel da LL-37 para regular resposta inflamatória induzida por patógenos é bem eficaz e bem estabelecida em literatura. Ao analisarmos estudos até mesmo sobre fragmentos derivados desta catelicidina, como IG-19, veremos que esta também pode suprimir citocinas inflamatórias. A LL-37 parece estar envolvida na regulação de inflamação crônica imunomediada, principalmente quando associada ao RVD na capacidade de intervir nos inflamossomas. Adicionalmente, a atividade da LL-37 parece ser independente do recrutamento de células imunes ou mesmo da indução da IL-10 em modelos animais com artrite inflamatória (CHOI; NAPPER, 2014). A diferenciação dos monócitos em macrófagos, por exemplo, pode ser afetada pela concentração de LL-37 (VAN DER DOES et al., 2010) e, consequentemente, na produção das citocinas inflamatórias com inibição da expressão da IL-10, que exerce efeito regulador, e aumenta a expressão da IL-1b que exerce efeito inflamatório (YU et al., 2007).

Todavia, estudos *in vitro* apontam uma relação da indução da produção de IL-10 na presença da LL-37, sendo variável de acordo com a concentração, tipo celular e estímulo inflamatório promovido (KANDA et al., 2010). Parece haver alças regulatórias dependentes da concentração e do estímulo, envolvendo a LL-37 em vias tanto inflamatórias, quanto em anti-inflamatórias (VAN DER DOES et al., 2010). Contudo, a maioria dos estudos envolvendo modelos animais ou análise de citocinas em culturas celulares humanas restringiram-se a poucos tipos de doenças autoimunes, principalmente na psoríase e na artrite reumatoide. Não encontramos na literatura um estudo de análise direta de citocinas ligadas a expressão aumentada de LL-37 com doenças desmielinizantes, como a Esclerose Múltipla.

Ao estudar a relação de EM com LL-37 podemos traçar um perfil inflamatório-autoimune-infeccioso que, de certa forma, parece “substituir” o fator de risco tabagismo. Nos Estados Unidos, Canadá e países europeus, estudos apontam o fumo como importante fator de risco e gatilho de surtos, havendo forte associação do mesmo às formas EMSR e EMSP de Esclerose Múltipla, e uma associação moderada com o prognóstico clínico. No entanto, não parece haver uma associação clara na conversão de CIS para EM clinicamente definida (DEGELMAN; HERMAN, 2017). No presente estudo, apenas 6,4% dos pacientes eram fumantes, sendo uma paciente do subgrupo de expressão gênica aumentada para LL-37, utilizando Interferon há menos de três meses, e estável por todo período observado, além de um outro paciente fumante do subgrupo sem expressão de LL-37, IL-10 ou INFb e sem agravo clínico. Desta forma, não podemos evidenciar o tabagismo como um forte fator determinante de mau prognóstico ou fator causal da doença em nossa amostra, o que nos leva a sugerir que

no Brasil, especialmente no Nordeste, existam outros fatores de risco preponderantes, ainda com escassez de estudos e da determinação do perfil molecular de nossa população, que provavelmente, sejam distintos das populações europeias e norte-americanas. O perfil de quadros infecciosos, subclínicos e quase imperceptíveis para serem relatados previamente aos surtos clínicos dos pacientes, precisa ser melhor estudado na população brasileira como um importante fator desencadeante de gatilhos para surtos, bem como da desregulação da resposta imune perpetuada. Esses estímulos antigênicos podem levar a uma constante dificuldade do sistema imune em ativar mecanismos celulares e moleculares para vias regulatórias eficazes, seja por alterações da expressão gênica ou seja por defeitos nas vias sinalizadoras.

Em relação a IL-10, sólidos dados da literatura, a apontam como uma importante citocina mediadora entre micróglia, astrócitos e neurônios, no sentido de regular reações inflamatórias. Muitos estudos indicam, que uma produção defeituosa da IL-10, ou mesmo defeitos em suas vias de sinalização, em modelos humanos e animais, estaria relacionado a doenças neurológicas desde neuropatias dolorosas (LOBO-SILVA et al., 2016), doença de Alzheimer (KIYOTA et al., 2011), doença de Parkinson (ARIMOTO et al., 2007) e Esclerose Múltipla (HESSE et al., 2011). Além da função regulatória em reduzir a expressão do MHC II e, consequentemente, reduzir a apresentação de antígenos para os linfócitos T, também parece agir no aumento da expressão de mecanismos antiapoptóticos, configurando assim, um importante mecanismo de proteção do sistema nervoso central (MOORE et al., 2001). A IL-10 foi expressa em pacientes utilizando diferentes medicações, com distintos mecanismos de ação, tanto naqueles que se tornaram estáveis quanto nos que vieram a apresentar falha terapêutica. Uma explicação possível seria o fato de que este subgrupo de expressão positiva para IL-10 também havia estado em estágios inflamatórios recentes, sem necessariamente apresentar-se como surto clínico. De forma que, a expressão de IL-10 pode representar a tentativa de remielinização dos tecidos inflamados ou como um *feedback* negativo na atividade dos linfócitos ativados, através da estimulação das células T regulatórias. O aumento de IL-10 pode não ser um mecanismo totalmente eficaz neste subgrupo de pacientes que evoluem com doença desfavorável. Possíveis defeitos nas vias de sinalização, durante tentativa de regular a atividade inflamatória, não pôde ser aferida nesta presente análise. Nesta hipótese, os pacientes com falha terapêutica, seriam hipoteticamente aqueles cujas alças regulatórias dependentes de IL-10 não foram eficazes e, talvez esta incapacidade seja inerente ao fato do desenvolvimento da EM. É provável que no caso das pacientes de prognóstico favorável (P3, P14, P19 e P20) o aumento de expressão da IL-10 esteja ligado apenas à fase de resolução dos processos inflamatórios agudos, obtendo bom controle ao longo do tempo, enquanto nos demais pacientes que

evoluíram desfavoravelmente, o aumento de expressão se deu por uma tentativa constante, porém ineficaz de controlar o processo inflamatório.

Em culturas de astrócitos e de micróglia, foi observado que o LL-37 induzia a liberação de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas por ativação das vias inflamatórias intracelulares com estímulo do NF-kb. Os níveis de IL-1b e de IL-6 são relatados como resposta positiva ao estímulo pela LL-37 em micróglia e astrócitos (VAN WAGONER; BENVENISTE, 1999) (BRANDENBURG et al., 2010) (LEE et al., 2015). Estes dados não corroboram com os achados do presente estudo, uma vez que não foi identificada a expressão de IL-6 em nenhum dos pacientes. É possível que o aumento da expressão gênica desta citocina inflamatória não tenha sido detectada em sangue periférico por possuir uma atividade basal em tecidos neurais, necessitando de avaliações de amostras de tecido cerebral ou de LCR.

Foi encontrada expressão de IL-18, em apenas uma paciente de nossas amostras, a P17 que também expressou LL-37. Inclusive a escolha de análise da expressão da IL-18 recaiu sobre o fato de que a mesma é pouco descrita em estudos relacionados a EM, porém já foi relacionada a outras doenças autoimunes, como Lúpus, também associada a LL-37 (KAHLENBERG; KAPLAN, 2013). Portanto, em nossa análise, não encontramos uma relação importante entre o aumento de expressão da LL-37 com o aumento da expressão da IL-18, conforme descrito em literatura.

Curiosamente, no contexto de uma enfermidade cuja causa principal é inflamação, não foram expressadas nenhuma das citocinas pró-inflamatórias testadas (IL-6 e IL-18) além da LL-37 que pode comportar-se como promotora ou reguladora. Mesmo na conjuntura de pacientes recém saídos de surtos clínicos, com pouco tempo de uso de medicação ou com evolução desfavorável ao longo do tempo, não foi possível detectar aumento de expressão dessas citocinas de perfil inflamatório. Este resultado pode indicar que, no período de coleta das amostras, predominava um mecanismo de reparação/regulação inflamatória após os surtos ou mesmo que nos casos desfavoráveis os processos imunes anti-inflamatórios haviam se sobreposto aos processos pró-inflamatórios. Além disso, pode ter sido um período de atividade inflamatória em níveis apenas confinada ao tecido neural.

A tentativa de remielinização do SNC é constante, sob ataque inflamatório, entretanto o mecanismo basal que o ativa e o motivo da frequente falha ainda não é totalmente compreendido. A ativação das células progenitoras dos oligodendrócitos (CPO), responsáveis pela mielina no SNC, é dependente da atividade elétrica remanescente, com liberação de glutamato, que recruta essas células a se diferenciarem em oligodendrócitos. Bloqueios dos receptores glutamatérgicos, em modelos *in vivo* reduz essa diferenciação celular levando a

perda da função neuronal (JAMES et al., 2015). Em modelos murinos, notadamente para lesões desmielinizantes medulares, foi possível reduzir a expressão das Proteoglicanas Condroitina-Sulfato, que regulam negativamente a remielinização e aumentar a expressão de IL-10, notadamente promotora da mielina nos focos de desmielinização (KATARIA et al., 2017). Tais achados são compatíveis com a nossa análise, que encontrou nesse grupo de pacientes, recém saídos de surtos clínicos, com pouco tempo de terapia medicamentosa ou evolução para falhas terapêuticas, expressão aumentada de IL-10 para onze, dos 22 pacientes, independente dos níveis séricos de vitamina D.

Ainda não está totalmente clara a relação de infecções, principalmente virais, com os gatilhos para o desenvolvimento ou perpetuação de surtos em pacientes susceptíveis a expressar quadro clínico compatível com desmielinização. Seja este mecanismo, mimetismo molecular ou desregulação imune. Todavia, não faltam exemplos outros como as meningites assépticas, que são respostas imunes aos tecidos não neurais decorrentes de ataques virais (VENKATESAN; JOHNSON, 2014). No entanto, o perfil pro-inflamatória da microbiota intestinal dos pacientes tem sido relacionado com a agressividade das formas desmielinizantes de doença, apesar deste tipo de desbalanço entre micro-organismos comensais de perfil anti e pró-inflamatórios, ser de difícil análise.

No presente estudo, a positividade para LL-37 e IL-10 parece ter um papel regulador da inflamação, conforme estudos prévios, demonstrando que foram ativados mecanismos imunes para regular a atividade inflamatória subjacente, ou mesmo que, gatilhos infecciosos ainda estejam ativados. A despeito de alguns pacientes relatarem espontaneamente problemas recorrentes de gengivite ou que, simplesmente, não realizam qualquer manutenção/profilaxia de enfermidades odonto-orais, seria importante incluir análises odontológica e gengival dos mesmos, uma vez que já há associação destas infecções com complicações da esclerose múltipla, como a relação de sintomas orais infecciosos precedendo surtos clínicos (ONTANEDA et al., 2017). Ainda em relação aos gatilhos infecciosos, devemos enfatizar que a população estudada passou por epidemias recorrentes de arboviroses e outros vírus endêmicos, que causam outras modalidades de doenças inflamatórias como mielites longitudinalmente extensas ou mesmo Encefalomielites Desmielinizantes Agudas.

Estudos apontam a forte relação na capacidade da vitamina D, em modelos celulares, em inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon-γ e aumentar a expressão, do que seria uma contraparte anti-inflamatória através da via da IL-10. Não fica totalmente claro se este modelo, em cultura de células, se aplicaria ao modelo *in vivo*, com o mesmo comportamento de ativação dessas vias moleculares. Em nossos achados, encontramos

positividade para expressão aumentada de IL-10 em pacientes que estariam, possivelmente, em fase de platô de um processo inflamatório. Curiosamente, não foi evidenciado que os indivíduos saudáveis apresentavam uma maior expressão de citocina anti-inflamatória e sim o oposto, em nossa pequena amostra. Compatível com os achados dos estudos para Tregs FoxP3+, na qual percebe-se que seu número não difere entre indivíduos afetados e controles, ocorrendo na verdade um problema funcional destas células por falhas na maturação e migração (ZOZULYA; WIENDL, 2008), ou seja, a matriz celular parece não estar reduzida, obrigatoriamente, portanto uma hipótese alternativa, seja que as vias sinalizadoras ligadas a IL-10 podem não estar totalmente eficazes, conforme citado anteriormente. Entretanto, não explicam quase completa ausência dos marcadores sabidamente inflamatórios (IL-6 e IL-18) em nossa amostra de pacientes, que teve positividade de IL-18 para uma única paciente.

Sobre o INFγ, estudos apontam a importância desta molécula na indução da produção de IL-10 por células Th17, o que poderia ser um mecanismo regulatório importante para este perfil de linfócitos, considerado juntamente com o Th1, como agressivos para Esclerose Múltipla. Estudos em modelos celulares mostram que o INFγ endógeno promove um desbalanço entre IL-17 e IL-10, havendo maior produção desta última. Em modelos *in vivo* também existem evidências dessa indução da INFγ na produção de IL-10 por células T antígeno-específicas, tanto linhagens Th1 quanto Th17. Este mesmo estudo reforça ainda o fato de que, através do mecanismo descrito, foi observado que, na EAE, a INFγ foi capaz de reduzir a atividade de células Th17 encefalitogênicas em murinos (ZHANG et al., 2011). A partir desses dados, poderíamos interpretar a positividade encontrada, em alguns pacientes para aumento de expressão de INFγ como parte de uma ativação de mecanismos regulatórios diante do estresse provocado pelo surto da doença. Dentro do perfil já discutido, de pacientes cujas amostras foram colhidas próximo aos surtos clínicos, pouco tempo de medicação ou um perfil mais agressivo de doença, evidenciamos que quatro apresentaram isoladamente positividade para INFγ com outros 4 pacientes apresentando positividade para INFγ e IL-10, concomitantemente.

Já em relação aos casos progressivos, é possível que a atividade inflamatória que leve a atrofia, sem a ocorrência de novas lesões ou lesões captantes de contraste nos exames de ressonância, se processe em ritmo lento e gradual, não sendo possível mensurar essa atividade em sangue periférico. Estudos do líquido cefalorraquiano talvez possam representar melhor essa atividade basal e contínua das formas Secundariamente Progressivas. Entretanto, é preciso encontrar soluções pouco invasivas para um monitoramento da atividade inflamatória e até mesmo a capacidade de predizer o prognóstico da doença por amostras de sangue periférico,

como foi um dos objetivos gerais nesta análise. Enfatizamos que foi encontrado um perfil de pacientes de doença avançada, porém não identificamos os possíveis marcadores que mostrassem atividade de doença para estas 3 moléculas testadas, nem mesmo para as citocinas sabidamente inflamatórias.

6 CONCLUSÃO

Diante de grupos com características clínicas e terapêuticas distintas, foi possível realizar uma observação, do ponto de vista evolutivo entre 6 e 10 meses, e encontrar uma relação entre o aumento de expressão de LL-37 e de citocinas, associada ou não ao pouco tempo de uso medicação (menor que 3 meses) com o aumento de expressão gênica para quaisquer dos 3 marcadores estudados, seja LL-37, IL-10 ou INFγ.

A maioria dos pacientes de pior prognóstico e com aumento de expressão gênica para LL-37 apresentavam níveis insuficientes de vitamina D em períodos próximos a coleta das amostras. O aumento de expressão para IL-10 em um grupo de pacientes cuja coleta esteve próxima da atividade inflamatória pode refletir uma ativação dos mecanismos compensatórios e de *feedback* negativo para regular a atividade inflamatória desmielinizante. A expressão aumentada de LL-37 e IL-10 pode contribuir, em amostras mais numerosas de pacientes, na determinação de quais pacientes podem apresentar um pior prognóstico ou pouca resposta a medicação instituída como primeira escolha.

Estudos adicionais com maior número de amostras, maior tempo de observação da evolução clínica serão necessários para melhor caracterização deste grupo de pacientes. Adicionalmente, a inclusão de novas moléculas, tais como a IL-1γ e os *Toll-like receptor* (TLR), pode auxiliar na compreensão do papel da LL-37 na esclerose múltipla.

REFERÊNCIAS

ADA, Hiroyuki T. et al. duction in human gingival epithelial cells. [s. l.], v. 38, n. 3, p. 167–173, 2017.

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.

ALVES-LEON, Soniza Vieira et al. Zika virus found in brain tissue of a multiple sclerosis patient undergoing an acute disseminated encephalomyelitis-like episode. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], p. 135245851878199, 2018. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458518781992>

ARIMOTO, Toyoko et al. Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. [s. l.], v. 28, p. 894–906, 2007.

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.

BARRY, Michele; BLEACKLEY, R. Chris. CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES : ALL ROADS LEAD TO DEATH. [s. l.], v. 2, n. June, p. 1–9, 2002.

BEVINS, C. L. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. **Biochemical Society Transactions**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 263, 2006. Disponível em: <http://www.biochemsoctrans.org/bst/034/bst0340263.htm>

BRANDENBURG, Lars-ove et al. Role of Glial Cells in the Functional Expression of LL-37 / Rat Cathelin-Related Antimicrobial Peptide in Meningitis. [s. l.], v. 67, n. 11, p. 1041–1054, 2008.

BRANDENBURG, Lars Ove et al. Antimicrobial peptide rCRAMP induced glial cell activation through P2Y receptor signalling pathways. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 47, n. 10, p. 1905–1913, 2010. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.03.012>

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>

BUCKI, Robert; JANMEY, Paul A. Interaction of the gelsolin-derived antibacterial PBP 10 peptide with lipid bilayers and cell membranes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 2932–2940, 2006.

C., Evans et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the americas: A systematic review. **Neuroepidemiology**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 195–210, 2013. Disponível em: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed11&NEWS=N&AN=2013234304>

CALABRESE, Massimiliano et al. Exploring the origins of grey matter damage in multiple sclerosis. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 147–158, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3900>

CALDITO, Natalia Gonzalez et al. Brain and retinal atrophy in African-Americans versus Caucasian-Americans with multiple sclerosis: a longitudinal study. **Brain**, [s. l.], p. 1–15, 2018. Disponível em: <http://doi.org/10.1093/brain/awy245>

CASTILLO-TRIVINO, Tamara et al. Rituximab in Relapsing and Progressive Forms of Multiple Sclerosis: A Systematic Review. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2013.

CHAMORRO, Clara I. et al. The human antimicrobial peptide LL-37 suppresses apoptosis in keratinocytes. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 937–944, 2009.

CHAO, Michael J. et al. Epigenetics in multiple sclerosis susceptibility: Difference in transgenerational risk localizes to the major histocompatibility complex. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 261–266, 2009.

CHOI, Ka-yee G.; NAPPER, Scott. Human cathelicidin LL-37 and its derivative IG-19 regulate interleukin-32-induced inflammation. [s. l.], p. 68–80, 2014.

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.

CONFAVREUX, Christian; VUKUSIC, Sandra. Natural history of multiple sclerosis: A unifying concept. **Brain**, [s. l.], v. 129, n. 3, p. 606–616, 2006.

CORREALE, Jorge; FAREZ, Mauricio F. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 1162–1169, 2011.

COSORICH, Ilaria et al. High frequency of intestinal TH17 cells correlates with microbiota alterations and disease activity in multiple sclerosis. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 7, 2017.

COUGHLAN, Catherine A. et al. The effect of Aspergillus fumigatus infection on vitamin D receptor expression in cystic fibrosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 186, n. 10, p. 999–1007, 2012.

CREE, Bruce A. C. et al. Gut microbiome analysis in neuromyelitis optica reveals overabundance of Clostridium perfringens. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 443–447, 2016.

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. 1–12, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12913-016-1352-3>

DEGELMAN, Michelle L.; HERMAN, Katya M. **Author ' s Accepted Manuscript Smoking and Multiple Sclerosis : A Systematic Review and Meta-Analysis Using the Bradford Hill Criteria**. [s.l.] : Elsevier B.V., 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2017.07.020>

DING, Ye et al. Porphyromonas gingivalis, a periodontitis causing bacterium, induces memory impairment and age-dependent neuroinflammation in mice. **Immunity and Ageing**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–8, 2018.

DOMINY, Stephen S. et al. Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. [s. l.], p. 1–22, 2019. Disponível em: <https://m.medicalxpress.com/news/2019-01-bacterial-pathogen-porphyromonas-gingivalis-contribute.html?fbclid=IwAR26QPrpVePJKOlGRwb_wCVqRJilxO6WKLP4geH9x1aEmX8r5xjh4S86a3o>

ELKON, Keith B.; SANTER, Deanna M. Complement, interferon and lupus. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 665–670, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.004>

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>

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.

GENNARO, Renato 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. **Brain**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 343–369, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00013-3>. Acesso em: 20 out. 2018.

GENNARO, Renato; ZANETTI, Margherita. Structural Features and. [s. l.], 2000.

GIOVANNONI, Gavin. Personalized medicine in multiple sclerosis. **Neurodegenerative disease management**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 13–17, 2017.

GOBIN, S. A. M. J. P.; MONTAGNE, Lisette; ZUTPHEN, Marlijn V. A. N. Upregulation of Transcription Factors Controlling MHC Expression in. [s. l.], v. 77, n. June, p. 68–77, 2001.

GREENFIELD, Ariele 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, 2018.

GREER, Ristan M. et al. Serum vitamin D levels are lower in Australian children and

adolescents with type 1 diabetes than in children without diabetes. **Pediatric Diabetes**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 31–41, 2013.

HAIDER, Lukas et al. The topograpy of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. **Brain**, [s. l.], v. 139, n. 3, p. 807–815, 2016.

HARLEY, John B.; JAMES, Judith A. Epstein-Barr virus infection induces lupus autoimmunity. **Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases**, [s. l.], v. 64, n. 1–2, p. 45–50, 2006.

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.

HAUSER, Stephen L. et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 376, n. 3, p. 221–234, 2017. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1601277>

HEDSTRÖM, A. K. et al. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 788–793, 2011.

HEDSTRÖM, A. K. et al. Smokers run increased risk of developing anti-natalizumab antibodies. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 20, n. 8, p. 1081–1085, 2014.

HEIDI, By; MALONI, Wynn. Multiple sclerosis : **Nurse Practitioner**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 24–35, 2013.

HESSE, D. et al. Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon- b in multiple sclerosis ? [s. l.], p. 266–272, 2011.

HEYDARPOUR, Pouria et al. Potential impact of air pollution on multiple sclerosis in Tehran, Iran. **Neuroepidemiology**, [s. l.], v. 43, n. 3–4, p. 233–238, 2014.

HUBER, Magdalena et al. IL-17A secretion by CD8 + T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. [s. l.], v. 123, n. 1, 2013.

INOMATA, Megumi; INTO, Takeshi; MURAKAMI, Yukitaka. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by Porphyromonas gingivalis cells and extracts in human gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 118, n. 6, p. 574–581, 2010.

JAMES, Fiona et al. glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors. [s. l.], 2015.

JIANG, Yuan Yuan et al. The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 106, n. 12, p. 1680–1689, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmed.2012.08.018>

JÖNSSON, D.; NILSSON, B. O. The antimicrobial peptide LL-37 is anti-inflammatory and proapoptotic in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontal Research**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 330–335, 2012.

KAHLENBERG, J. M. et al. Neutrophil Extracellular Trap-Associated Protein Activation of the NLRP3 Inflammasome Is Enhanced in Lupus Macrophages. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 190, n. 3, p. 1217–1226, 2013. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1202388>

KAHLENBERG, J. M.; KAPLAN, M. J. Little Peptide, Big Effects: The Role of LL-37 in Inflammation and Autoimmune Disease. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 191, n. 10, p. 4895–4901, 2013. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1302005>

KANDA, Naoko et al. Increased serum leucine , leucine-37 levels in psoriasis : Positive and negative feedback loops of leucine , leucine-37 and pro- or anti-inflammatory cytokines. **HIM**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1161–1171, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2010.09.005>

KATARIA, Hardeep et al. Neuregulin-1 promotes remyelination and fosters a pro-regenerative inflammatory response in focal demyelinating lesions of the spinal cord. [s. l.], n. July, 2017.

KILSGÅRD, Ola et al. Peptidylarginine deiminases present in the airways during tobacco

smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 240–248, 2012.

KIYOTA, T. et al. ORIGINAL ARTICLE AAV serotype 2 / 1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP + PS1 mice. [s. l.], v. 19, n. 7, p. 724–733, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/gt.2011.126>

KOBELT, Gisela et al. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1123–1136, 2017. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1352458517694432>. Acesso em: 20 out. 2018.

KOCH-HENRIKSEN, Nils; SØRENSEN, Per Soelberg. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 520–532, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8>

KOHM, 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.

KOZOVSKA, M. E. et al. Interferon beta induces T-helper 2. [s. l.], 1999.

KUHLE, J. et al. A 10-year follow-up of the European multicenter trial of interferon β-1b in secondary-progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 533–543, 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.

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.

LEE, Moonhee et al. Human antimicrobial peptide LL-37 induces glial-mediated neuroinflammation. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 130–141, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.003>

LIU, P. T. et al. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 4, p. 2060–2063, 2007. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.4.2060>

LIU, Philip T. et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 267–273, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2584>

LOBO-SILVA, Diogo et al. Balancing the immune response in the brain : IL-10 and its regulation. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], p. 1–10, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-016-0763-8>

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. a.

LU, Xin et al. The host defense peptide LL-37 a possible inducer of the type I interferon system in patients with polymyositis and dermatomyositis. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], p. 1–11, 2016. b. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2016.12.003>

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>

MAGYARI, Melinda et al. Reproduction and the risk of multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1604–1609, 2013.

MALPASS, Katy. Multiple sclerosis: “Outside-in” demyelination in MS. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 61, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2011.217>

MARQUES, Vanessa Daccach et al. Brazilian Consensus for the Treatment of Multiple Sclerosis : Brazilian Academy of Neurology and Brazilian Committee on Treatment and Research in Multiple Sclerosis. [s. l.], n. May, p. 539–554, 2018.

MCGEER, Patrick L.; MCGEER, Edith G. Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease. **Journal of NeuroVirology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 529–538, 2002.

MICHEL, Laure et al. Unaltered regulatory B-cell frequency and function in patients with multiple sclerosis. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 155, n. 2, p. 198–208, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2014.09.011>

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.

MOORE, Kevin W. et al. I NTERLEUKIN -10 AND THE I NTERLEUKIN -10. [s. l.], v. 1, p. 683–765, 2001.

NAISMITH, R. T. et al. Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis. **Neurology**, [s. l.], v. 74, n. 23, p. 1860–1867, 2010.

ODOARDI, Francesca et al. T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. **Nature**, [s. l.], v. 488, n. 7413, p. 675–679, 2012.

OLSSON, Tomas; BARCELLOS, Lisa F.; ALFREDSSON, Lars. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 26–36, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2016.187>

ONTANEDA, Daniel et al. Multiple sclerosis 3 Progressive multiple sclerosis : prospects for disease therapy , repair , and restoration of function. **The Lancet**, [s. l.], v. 389, n. 10076, p. 1357–1366, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31320-4>

OREN, Ziv et al. in Phospholipid Membranes : Relevance To the Molecular Basis for Its Non-Cell-Selective Activity. **Biochemical Society**, [s. l.], v. 341, p. 501–513, 1999.

ORTON, Sarah Michelle et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. **Lancet Neurology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 932–936, 2006.

PARK, Kyungho et al. Regulation of cathelicidin antimicrobial peptide expression by an Endoplasmic Reticulum (ER) stress signaling, vitamin D receptor-independent pathway. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 286, n. 39, p. 34121–34130, 2011.

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.

PAULSEN, Friedrich et al. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 198, n. 3, p. 369–377, 2002.

PAVAN, Surya et al. Epstein-Barr virus encoded EBNA-3 binds to vitamin D receptor and blocks activation of its target genes. [s. l.], n. 07, p. 4249–4256, 2010.

PEREIRA-SANTOS, Marcos; YURE, José; QUEIROZ, Gisele. Epidemiology of vitamin D insufficiency and deficiency in a population in a sunny country : geospatial meta-analysis in Brazil. [s. l.], v. 8398, 2018.

PIA SORMANI, Maria. The Will Rogers phenomenon: the effect of different diagnostic criteria. **Journal of the Neurological Sciences**, [s. l.], v. 287, n. SUPPL. 1, p. S46–S49, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0022-510X(09)71300-0>

PIERROT-DESEILLIGNY, Charles; SOUBERBIELLE, Jean Claude. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? **Brain**, [s. l.], v. 133, n. 7, p. 1869–1888, 2010.

PRIETO GONZÁLEZ, José María. Tratamiento sintomático y del brote de esclerosis múltiple. **Medicina Clinica**, [s. l.], v. 143, n. S3, p. 39–43, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753(15)30009-9>

PROAL, Amy D.; ALBERT, Paul J.; MARSHALL, Trevor G. The human microbiome and autoimmunity. **Current Opinion in Rheumatology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 234–240, 2013.

PRYCE, Gareth; BAKER, David. Oligoclonal bands in multiple sclerosis; Functional significance and therapeutic implications. Does the specificity matter? **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, [s. l.], v. 25, p. 131–137, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.msard.2018.07.030>

RAGAB, Dina et al. Vitamin D status and its modulatory effect on interferon gamma and interleukin-10 production by peripheral blood mononuclear cells in culture. **Cytokine**, [s. l.], v. 85, p. 5–10, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2016.05.024>

RAMAGOPALAN, Sreeram V. et al. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 727–739, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70094-6>

ROSSINI, Maurizio et al. Vitamin D deficiency in rheumatoid arthritis: prevalence, determinants and associations with disease activity and disability. **Arthritis research & therapy**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. R216, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3046526&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ROTHHAMMER, Veit et al. Type i interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 586–597, 2016.

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

SCHRUMPF, J. A. et al. Interleukin 13 Exposure Enhances Vitamin D-Mediated Expression of the Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide 18 / LL-37 in Bronchial. [s. l.], v. 80, n. 12, p. 4485–4494, 2012.

SCOTT, M. G. et al. The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 169, n. 7, p.

3883–3891, 2002. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.169.7.3883>

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.

SINGHRAO, Sim K.; OLSEN, Ingar. Are Porphyromonas gingivalis Outer Membrane Vesicles Microbullets for Sporadic Alzheimer's Disease Manifestation? **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 219–228, 2018. Disponível em: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/ADR-180080>

SØRENSEN, Ole E. et al. Human cathelicidin , hCAP-18 , is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. [s. l.], v. 97, n. 12, p. 3951–3960, 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.

SVENSSON, Daniel; NEBEL, Daniel; NILSSON, Bengt Olof. Vitamin D3modulates the innate immune response through regulation of the hCAP-18/LL-37 gene expression and cytokine production. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 25–32, 2016.

TAKIGUCHI, T. et al. Cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 augments interferon- b expression and antiviral activity induced by double-stranded RNA in keratinocytes. [s. l.], p. 492–498, 2014.

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.

THOUVENOT, E. Should we treat patients with radiologically isolated syndrome (RIS)? Yes. **Revue Neurologique**, [s. l.], p. 8–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.05.001>

VAN DER DOES, A. M. et al. LL-37 Directs Macrophage Differentiation toward Macrophages with a Proinflammatory Signature. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185,

n. 3, p. 1442–1449, 2010. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1000376>

VAN WAGONER, Nicholas J.; BENVENISTE, Etty N. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 100, n. 1–2, p. 124–139, 1999.

VENKATESAN, Arun; JOHNSON, Richard T. **Infections and multiple sclerosis**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier B.V., 2014. v. 122 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00007-8>

VISWANATHAN, V. K.; HECHT, Gail. Innate immunity and the gut. **Current Opinion in Gastroenterology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 546–551, 2000.

WANG, Z. APD: the Antimicrobial Peptide Database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 32, n. 90001, p. 590D–592, 2004. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh025>

WENDEL-HAGA, M.; CELIUS, E. G. Is the hygiene hypothesis relevant for the risk of multiple sclerosis? **Acta Neurologica Scandinavica**, [s. l.], v. 136, n. August, p. 26–30, 2017.

WHITTON, P. S. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 150, n. 8, p. 963–976, 2007.

WINGERCHUK, Dean M. Smoking: Effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. **Therapeutic Advances in Neurological Disorders**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 13–22, 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.

YIN, Kai; AGRAWAL, Devendra K. Vitamin D and inflammatory diseases. **Journal of Inflammation Research**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 69–87, 2014.

YU, J. et al. Host Defense Peptide LL-37, in Synergy with Inflammatory Mediator IL-1 ,

Augments Immune Responses by Multiple Pathways. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 11, p. 7684–7691, 2007. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.179.11.7684>

ZAIOU, Mohamed. Multifunctional antimicrobial peptides : therapeutic targets in several human diseases. [s. l.], p. 317–329, 2007.

ZAMVIL, Scott S. et al. The Gut Microbiome in Neuromyelitis Optica. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 92–101, 2018.

ZHANG, Lixia et al. Type I INF Promotes IL-10 Production from T Cells to Suppress Th17 Cells and Th17-Associated Autoimmune Inflammation. [s. l.], v. 6, n. 12, 2011.

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.

ANEXO A

Kurtzke Expandede Disability Severuty Sacales (EDSS)

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.

FONTE: (KURTZKE, 1983)

ANEXO B

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. Morais 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 extrajudicial. 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:

ANEXO C

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

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

ANEXO D

Pesquisa sobre Aspectos Clínicos

PESQUISA PROSPECNEURO
AMBULATÓRIO DE DOENÇAS DESMIELINIZANTES

DATA:___/___/___

NOME:_____
REG:_____ DATA NASC:____/____/____
NÚMEROS DAS AMOSTRAS:_____
SEXO: MASC ( ) FEM ( )
IDADE:_____ EDSS:_____ DIAGNÓSTICO:_____
MEDICAÇÃO ATUAL:_____
MEDICAÇÕES PREGRESSAS:_____

VIT D:_____ (VALOR MAIS RECENTE)	FAZ REPOSIÇÃO ( )	NÃO REPÕE ( )
DOENÇA TIREOIDIANA QUAL:_____	SIM ( )	NÃO ( )
HISTÓRIA FAMILIAR DE DOENÇA TIREOIDIANA?	SIM ( ) QUAL PARENTESCO: _____	NÃO ( )
SE MULHER- USA ANTICONCEPCIONAL?	SIM ( )	NÃO ( )
OUTRA DOENÇA HORMONAL	SIM ( ) QUAL:_____	NÃO ( )
OUTRA DOENÇA AUTOIMUNE	SIM ( ) QUAIS:_____	NÃO ( )
DOENÇA AUTOIMUNE NA FAMÍLIA?	SIM ( ) QUAL E PARENTESCO:_____ _____	NÃO ( )
PASSADO DE CÂNCER?	SIM ( ) QUAL:_____	NÃO ( )
HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER?	SIM ( ) QUAL E PARENTESCO:_____ _____ _____ _____	NÃO ( )
PASSADO DE CANCER DE MAMA	SIM ( ) OBS:_____ _____ _____	NÃO ( )
REPÕE VITAMINA B12:_____	SIM ( )	NÃO ( )