



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

VICTÓRIA REGINA DA SILVA

**ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES SUPEREXPRESSOS NA  
ESCLEROSE MÚLTIPLA SECUNDÁRIA PROGRESSIVA:  
BUSCA DE PERFIS PATOGÊNICOS E POTENCIAIS  
BIOMARCADORES**

Recife  
2024

VICTÓRIA REGINA DA SILVA

**ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES SUPEREXPRESSOS NA  
ESCLEROSE MÚLTIPLA SECUNDÁRIA PROGRESSIVA:  
BUSCA DE PERFIS PATOGÊNICOS E POTENCIAIS  
BIOMARCADORES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Danyelly Brunaska Gondim Martins

Coorientadora: Jordana Marina da Silva

Recife  
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Victória Regina da.

Análise in silico de genes superexpressos na esclerose múltipla secundária progressiva: busca de perfis patogênicos e potenciais biomarcadores / Victória Regina da Silva. - Recife, 2024.

67 : il., tab.

Orientador(a): Danyelly Bruneska Gondim Martins

Coorientador(a): Jordana Marina da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

Inclui referências.

1. Esclerose Múltipla Secundária Progressiva. 2. Bioinformática. 3. Biologia Molecular. 4. Biomarcadores. 5. Vias Moleculares. I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim. (Orientação). II. Silva, Jordana Marina da. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

VICTÓRIA REGINA DA SILVA

**ANÁLISE *IN SILICO* DE GENES SUPEREXPRESSOS NA  
ESCLEROSE MÚLTIPLA SECUNDÁRIA PROGRESSIVA:  
BUSCA DE PERFIS PATOGÊNICOS E POTENCIAIS  
BIOMARCADORES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação  
em Biomedicina da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
pré-requisito à obtenção do título de  
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Bioquímica  
Instituto Keizo Asami - UFPE/ Laboratório de Prospecção Molecular e Bioinformática

---

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Patologia  
Instituto Keizo Asami - UFPE/ Laboratório de Patologia Molecular e Medicina Genômica

---

MSc. Kleiton de Barros Borges  
Instituto Real Neuro- Real Hospital Português/ Departamento de LCR e Neuroimunologia  
Hospital da Restauração/ Programa de Residência Médica em Neurologia

A Deus, que dá sabedoria e  
entendimento aos que procuram,  
dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, que esteve iluminando meus passos com sua graça em todo momento e que por meio de sua benevolência me deu a vontade tanto de querer como de realizar o trabalho que agora concluo.

À minha orientadora, Dra. Danyelly Brunaska, quem aprecio pela alegria e leveza que acolhe a vida em qualquer situação e que, com sua maneira singular de enxergar incógnitas e soluções, me ensinou pacientemente a explorar novas perspectivas. Agradeço especialmente por ter despertado em mim a curiosidade pelo vasto mundo de vias e moléculas através de suas aulas excepcionais.

À minha coorientadora, Jordana Marina, por sua disposição, sinceridade e atenção ao longo deste ano. Trabalhar com você tornou o processo mais agradável.

Aos professores Will de Barros Pita e Lucas Brandão pelo conhecimento fornecido nas disciplinas eletivas que ministraram com tanto entusiasmo, alimentando assim minha curiosidade pela biologia molecular.

À professora Priscila Gubert sou grata pelo crescimento acadêmico que me proporcionou no período de monitoria e sobretudo na Laece.

Agradeço ainda a Rhayanny Santos e Gabriela Rodrigues por nossa amizade que iniciou nesta jornada da graduação e que floresceu em meio a cada dificuldade que superamos, nos dando hoje frutos de resiliência e afabilidade. Vocês são luz e exemplo para mim.

Aos amigos Lucas Medeiros e Rosana Nobre, que tive o prazer de conhecer ao longo do caminho, sou grata pelo que aprendi e compartilhei com vocês, pessoas tão brilhantes.

Agradeço aos meus familiares. À minha mãe, que se dedicou sempre pelo bem-estar dos filhos; ao meu pai, pelo sustento e orientações acadêmicas; às minhas irmãs e ao meu irmão pelo incentivo que me dão ao acreditar que posso ir mais além.

Por fim, sou imensamente grata à UFPE pelas oportunidades que me ofereceu e aos professores que contribuíram na minha formação acadêmica e profissional, em especial aos que tive o privilégio de trabalhar como monitora.

“Plantei dias sonhados, esperei a chuva. Quando ela veio, temi a tempestade. Agora, só via noites molhadas. Amanheci com o sol gritando da janela: “Acorda! Sequei a noite molhada. Tem lá fora uma jornada plantada que espera o fim da tua cara chorada. Com mais sementes nas mãos e um pé que já vai na estrada”.

**Clarice Freire**

SILVA, Victória Regina da. **Análise *in silico* de genes superexpressos na esclerose múltipla secundária progressiva:** busca de perfis patogênicos e potenciais biomarcadores. 2024. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa que afeta em torno de 2,8 milhões de pessoas no mundo, sendo a maioria adultos em idade ativa. Os distúrbios moleculares causadores da sua patogênese seguem incertos, mas sabe-se que linfócitos participam na destruição autoimune da bainha de mielina, prejudicando o envio de sinais nervosos à periferia do corpo. Sintomas motores, visuais, cognitivos e psicológicos fazem parte do conjunto de perturbações fisiológicas da doença. Quatro fenótipos clínicos são observados, dos quais a esclerose múltipla secundária progressiva (EMSP) apresenta um diagnóstico mais complexo. Como resultado, é comum haver atrasos no diagnóstico e exposição a terapias pouco eficazes no controle da progressão, o que gera efeitos colaterais indesejáveis e ônus econômico. Sabendo que os eventos clínicos na condição são precedidos por eventos moleculares, o objetivo deste estudo foi caracterizar seu perfil molecular para identificar genes e vias biológicas desregulados positivamente em lesões da EMSP. Para tanto, foram usados conjuntos de dados transcriptômicos depositados no MS Atlas, referentes a lesões da EMSP do tipo ativa, inativa, crônica ativa, remielinizante e substância branca de aparência normal (NAWM). Os *plug-ins* String-App e MCODE foram executados no Cytoscape para a identificação de redes de interação e *clusters*. A plataforma g:Profiler realizou o enriquecimento funcional de vias. Genes desregulados em outras doenças neurodegenerativas foram excluídos com base nos dados do Allen Brain Map e Expression Atlas. Inicialmente, foram selecionados 4.800 genes superexpressos entre as lesões, dos quais apenas 2.375 foram considerados específicos dentre as lesões. Após as análises computacionais, apenas 172 genes seguiram no estudo, sendo as lesões crônica ativa, inativa, ativa e remielinizante associadas a 87, 51, 15 e 16 vias específicas, respectivamente. A via Wnt não canônica foi associada ao desenvolvimento da lesão crônica ativa por meio do gene WNT5A, o que corrobora com a ação inflamatória de micróglia. Na lesão inativa, foi discutido o papel de HSP90AA1 na inibição da ação de HSPs na via de atenuação da ação de chaperonas, o que limita a resposta ao estresse. Como esperado, a lesão ativa se associou a diversos eventos imunológicos, como a sinalização por interferons. O gene CFLAR parece ser essencial para perpetuar a resposta de linfócitos nessa lesão ao inibir a morte celular. A lesão remielinizante apresentou genes superexpressos associados ao reparo tecidual, diminuição da permeabilidade na BHE e aumento do metabolismo do colesterol, dentre os quais destacam-se COL4A6 e HSPG2. NAWM foi excluída da análise por não conter genes específicos na rede de interação. Nossos dados demonstram que diferentes perfis moleculares coexistem na EMSP e contribuem com sua patogênese. Estudos clínicos e laboratoriais são necessários para validar o uso dos genes citados como biomarcadores.

**Palavras-chave:** Esclerose Múltipla Secundária Progressiva. Bioinformática. Biomarcadores Moleculares. Vias biológicas. Transcriptoma.

SILVA, Victória Regina da. ***In silico* analysis of overexpressed genes in secondary progressive multiple sclerosis**: identifying pathogenic profiles and potential biomarkers. 2024. 67. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease that affects around 2.8 million people worldwide, most of them working-age adults. The molecular trigger causing its pathogenesis remains unclear, but it is known that lymphocytes participate in the autoimmune destruction of the myelin sheath, impairing the transmission of nerve signals to the periphery of the body. Motor, visual, cognitive, and psychological symptoms are part of the range of physiological disturbances associated with the disease. Four clinical phenotypes are observed, of which secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) presents a more complex diagnosis. As a result, there are often delays in diagnosis and exposure to ineffective therapies to control progression, leading to undesirable side effects and economic burden. Knowing that the clinical events of the condition are preceded by molecular events, the aim of this study was to characterize the molecular profile to identify upregulated genes and biological pathways in SPMS lesions. For this purpose, were used transcriptomic datasets from the MS Atlas referring to SPMS lesions, including active, inactive, chronic active, remyelinating and normal-appearing white matter (NAWM). The String-App and MCODE plug-ins were executed in Cytoscape to identify interaction networks and clusters. The g:Profiler platform performed the functional pathway enrichment. Dysregulated genes in other neurodegenerative diseases were excluded based on data from the Allen Brain Map and Expression Atlas. Initially, 4,800 overexpressed genes were selected among the lesions, of which only 2,375 were considered lesion-specific. After computational analyses, only 172 genes remained in the study. The non-canonical Wnt pathway was associated with the development of chronic active lesions through the gene *WNT5A*, which supports an inflammatory response of microglia. In inactive lesions it was discussed the role of *HSP90AA1* in inhibiting HSPs in the attenuation pathway of chaperone action, which limits the stress response. As expected, active lesions were associated with various immunological events, such as interferon signaling. The gene *CFLAR* appears to be essential for perpetuating lymphocyte responses in these lesions by inhibiting cell death. Remyelinating lesions showed overexpressed genes associated with tissue repair, decreased blood-brain barrier permeability, and increased cholesterol metabolism, among which *COL4A6* and *HSPG2* were the most relevant. NAWM was excluded from the analysis due to the lack of specific genes in the interaction network. Our data demonstrate that different molecular profiles coexist in SPMS and contribute to its pathogenesis. Clinical and laboratory studies are needed to validate the use of the mentioned genes as biomarkers.

**Key words:** Secondary Progressive Multiple Sclerosis. Bioinformatics. Molecular biomarkers. Biological pathways. Transcriptome.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Distribuição global da EM.....	18
<b>Figura 2</b> – Distribuição etária e sexo de pacientes com EM.....	19
<b>Figura 3</b> – Mecanismos patogênicos da EM.....	22
<b>Figura 4</b> – Gráfico de frequência absoluta dos sintomas relatados em pacientes com EM.....	23
<b>Figura 5</b> – Disseminação espacial e temporal visualizadas por RM em cérebros com EM.....	26
<b>Figura 6</b> – Graus de comprometimento funcional de pacientes com EM de acordo com a EDSS.....	28
<b>Figura 7</b> – Lesões histopatológicas presentes na EM.....	30
<b>Figura 8</b> – Diagrama ilustrativo de redes de interação e módulos funcionais.....	33
<b>Figura 9</b> – Diagrama de Venn indicando o número de genes compartilhados e únicos nas cinco lesões histopatológicas da EMSP.....	38
<b>Figura 10</b> – Diagrama operacional da curadoria de dados feita para seleção de genes candidatos a biomarcadores nos cinco tipos de lesões da EMSP.....	39
<b>Figura 11</b> – Rede de interação molecular e clusters extraídos da lesão crônica ativa.....	42
<b>Figura 12</b> – Rede de interação molecular e <i>clusters</i> extraídos da lesão inativa....	43
<b>Figura 13</b> – Rede de interação molecular e <i>clusters</i> extraídos da lesão ativa.....	44
<b>Figura 14</b> – Rede de interação molecular e <i>clusters</i> extraídos da lesão remielinizante.....	45
<b>Figura 15</b> – Mapa de calor ilustrando a densidade de vias secundárias derivados das vias primárias em cada lesão da EMSP.....	47
<b>Figura 16</b> – Gráfico exibindo a distribuição e significância das 10 vias biológicas mais significativas em lesões de EMSP.....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Ranking das 3 principais vias específicas da lesão crônica ativa.....	49
<b>Tabela 2</b> – Ranking das 3 principais vias específicas da lesão inativa.....	50
<b>Tabela 3</b> – Ranking das 3 principais vias específicas da lesão ativa.....	51
<b>Tabela 4</b> – Ranking das 3 principais vias específicas da lesão remielinizante.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEM	Associação Brasileira de Esclerose Múltipla
AKR1C	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1 Member C3</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno
BHE	Barreira hematoencefálica
CASP8	Caspase 8
CDH6.	<i>Cadherin 6</i>
CDH7	<i>Cadherin 7</i>
CDH9	<i>Cadherin 9</i>
CFLAR	CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator
CIS	Síndrome clinicamente isolada
CLDN15	<i>Claudin 15</i>
CNP	<i>Cyclic nucleotide phosphodiesterase</i>
COL1A1	<i>Collagen Type I Alpha 1 Chain</i>
COL1A2	<i>Collagen Type I Alpha 2 Chain</i>
COL3A1	<i>Collagen Type III Alpha 1 Chain</i>
COL4A6	<i>Collagen Type IV Alpha 6 Chain</i>
CPZ	Cuprizona
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DNAJB1	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B1</i>
EAE	Encefalomielite experimental autoimune
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr vírus
EDSS	Escala Expandida do Estado de Incapacidade
EM	Esclerose múltipla
EMPP	Esclerose múltipla primária progressiva
EMRR	Esclerose múltipla recorrente-remitente
EMSP	Esclerose múltipla secundária progressiva
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADD	<i>Fas Associated Via Death Domain</i>
GlialCAM	<i>Glial cell adhesion molecule</i>
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
HLA-B	<i>Major Histocompatibility Complex, Class I, B</i>

HLA-DRA	<i>Major Histocompatibility Complex, Class II, DR Alpha</i>
HSF1	<i>Heat Shock Transcription Factor 1</i>
HSP90AA1	<i>Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1</i>
HSP90AB1	<i>Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class B Member 1</i>
HSPA1A	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A</i>
HSPA1L	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1 Like</i>
HSPA8	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8</i>
HSPG2	<i>Heparan Sulfate Proteoglycan 2</i>
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL-17	Interleucina 17
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL2RA	<i>Interleukin-2 Receptor Subunit Alpha</i>
IL7RA	<i>Interleukin-7 Receptor Subunit Alpha</i>
ITGB5	<i>Integrin Subunit Beta 5</i>
LAMA3	<i>Laminin Subunit Alpha 3</i>
LAMA5	<i>Laminin Subunit Alpha 5</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
lincRNA	<i>Long intergenic non-coding RNAs</i>
lncRNA	<i>Long noncoding RNA</i>
MAG	<i>Myelin-associated glycoprotein</i>
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOG	<i>Myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NAWM	<i>Normal appearing white matter</i>
NO	Óxido nítrico
PDGFB	<i>Platelet Derived Growth Factor Subunit B</i>
PLP	<i>Proteolipid protein</i>
PTGES3	<i>Prostaglandin E Synthase 3</i>
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
SDC2	<i>Syndecan 2</i>
SNC	Sistema nervoso central

SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
ST3GAL2	<i>ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 2</i>
TCR	Receptor de célula T
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNFRSF10B	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10b</i>
TNFRSF10A	<i>TNF Receptor Superfamily Member 10a</i>
TNFSF10	<i>TNF Superfamily Member 10</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	Linfócito T regulatório
Wnt	<i>Wingless-related integration site</i>
WNT5A	<i>Wnt Family Member 5A</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>17</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA EM.....	17
2.2	BASES FISIOPATOLÓGICAS.....	19
2.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	22
2.4	FATORES DE RISCO.....	24
2.5	DIAGNÓSTICO.....	25
2.6	AVALIAÇÃO DA INCAPACIDADE NA DOENÇA.....	28
2.7	PROGRESSÃO DA EMRR PARA EMSP.....	29
2.8	LESÕES HISTOPATOLÓGICAS NA EMSP.....	30
2.9	BIOLOGIA DE SISTEMAS.....	31
2.9.1	Redes de Interação Molecular.....	32
2.9.2	Enriquecimento Funcional.....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>36</b>
4.1	DADOS TRANSCRIPTÔMICOS.....	36
4.2	DEFINIÇÃO DOS GENES ESPECÍFICOS.....	36
4.3	REDE DE INTERAÇÃO E GRUPOS DE INTERAÇÃO.....	36
4.4	ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL.....	37
4.5	ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS.....	37
4.6	ANÁLISE DAS VIAS.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
5.1	SELEÇÃO DE GENES ESPECÍFICOS.....	38
5.2	REDES DE INTERAÇÃO MOLECULAR E CLUSTERS.....	41
5.3	VIAS ENRIQUECIDAS.....	46
5.3.1	Vias Secundárias Mais Significativas entre Lesões.....	47

5.3.2	Vias Secundárias Específicas da Lesão Crônica Ativa.....	49
5.3.3	Vias Secundárias Específicas da Lesão Inativa.....	49
5.3.4	Vias Secundárias Específicas da Lesão Ativa.....	50
5.3.5	Vias Secundárias Específicas da Lesão remielinizante.....	51
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a principal condição neurológica causadora de incapacidades em jovens adultos (MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION, 2020). Ao menos 2,8 milhões de pessoas são acometidas pela EM no mundo (WALTON et al., 2020), das quais 40 mil são brasileiras, segundo a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM, 2024). A etiologia desta condição bem como seus mecanismos moleculares não são claros, porém a neurodegeneração está relacionada a uma resposta imunomediada por linfócitos, que atacam e destroem a bainha de mielina presente em fibras axonais, resultando na interrupção de impulsos nervosos para diferentes órgãos e tecidos (REYNOLDS et al., 2011). Conseqüentemente, diversas funções fisiológicas podem ser comprometidas, como a motora, visual, cognitiva e psicológica (WHO, 2023). Apesar da chance de sobrevivência ser alta (MYHR et al., 2001), a evolução desta patologia pode levar a condições severas de incapacidade, difíceis de prever a longo prazo (CONFRAVEUX; VUKUSIC, 2006).

Quanto ao diagnóstico, não há um sinal patognomônico ou biomarcador específico que a diferencie de doenças similares (SOLOMON et al., 2016). A determinação do fenótipo clínico é feita com base na atividade e progressão da doença, sendo eles: síndrome clinicamente isolada (CIS) recorrente-remitente (EMRR), secundária progressiva (EMSP) e primária progressiva (EMPP) (LUBLIN et al., 2014). Embora a EMRR seja o curso mais frequente, dois terços desses pacientes progridem para a EMSP em até 28 anos após o diagnóstico, sendo metade deles nos 15 primeiros anos. Uma piora significativa no quadro é então observada, visto que quase todos precisarão de auxílio para caminhar e 58% deles estarão confinados a uma cama ou cadeira de rodas (SCALFARI et al., 2014). Nesse cenário, a caracterização do fenótipo da EMSP tem grande importância para mitigar os danos aos pacientes, que necessitam de uma abordagem terapêutica distinta da EMRR.

Na prática, o diagnóstico da EMSP é complexo pois desde o diagnóstico inicial de EM erros e atrasos de até 2,4 anos ocorrem devido à má compreensão e aplicação dos critérios de McDonald, principalmente em países subdesenvolvidos (CAVENAGHI et al., 2017; SOLOMON et al., 2021). Até o momento, não há critérios clínicos ou paraclínicos capazes de determinar o ponto exato de transição entre

EMRR e EMSP (LUBLIN et al., 2014). Por essa razão, o diagnóstico definitivo da EMSP sofre um atraso médio de mais 3 anos, o que expõe o paciente a terapias ineficazes para a fase progressiva, resultando em efeitos colaterais e gastos desnecessários ao mesmo tempo em os sintomas se agravam (SAND et al., 2014; ROJAS et al., 2021).

A nível imunohistoquímico, o cérebro de indivíduos com EM apresentam 5 padrões de lesões: ativa, inativa, crônica ativa, remielinizante e de aparência normal (FRISCH et al., 2020; ELKJAER et al., 2019; FRISCHER et al., 2015; LUCHETTI et al., 2018). Esses padrões podem coexistir nos fenótipos clínicos, incluindo EMSP, sendo importante investigar individualmente cada um deles para a correta caracterização do perfil molecular da EMSP. Uma vez que a expressão clínica da patologia é precedida pela mobilização de um conjunto mecanismos moleculares, investigá-los pode auxiliar na caracterização de vias e genes importantes na patogênese da EMSP, úteis para a inferência de biomarcadores.

A principal forma de identificar genes candidatos a marcadores é analisando o perfil de expressão gênica da doença, obtido por técnicas como sequenciamento de RNA, microarrays e qPCR. Contudo, esses processos são relativamente caros e demorados, especialmente em análises de transcriptoma completo. Uma alternativa viável e econômica a essas técnicas é a análise de conjuntos de genes já armazenados em bancos de dados disponíveis publicamente (FRISCH et al., 2020). Aplicando ferramentas de biologia de sistemas, é possível fazer análises de enriquecimento funcional desses conjuntos de dados e inferir quais são principais as vias e mecanismos desregulados e genes chave na patologia investigada (RAUDVERE et al., 2019). Portanto, esse estudo visa identificar genes candidatos a biomarcadores e vias envolvidas na patogênese de diferentes lesões da EMSP.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

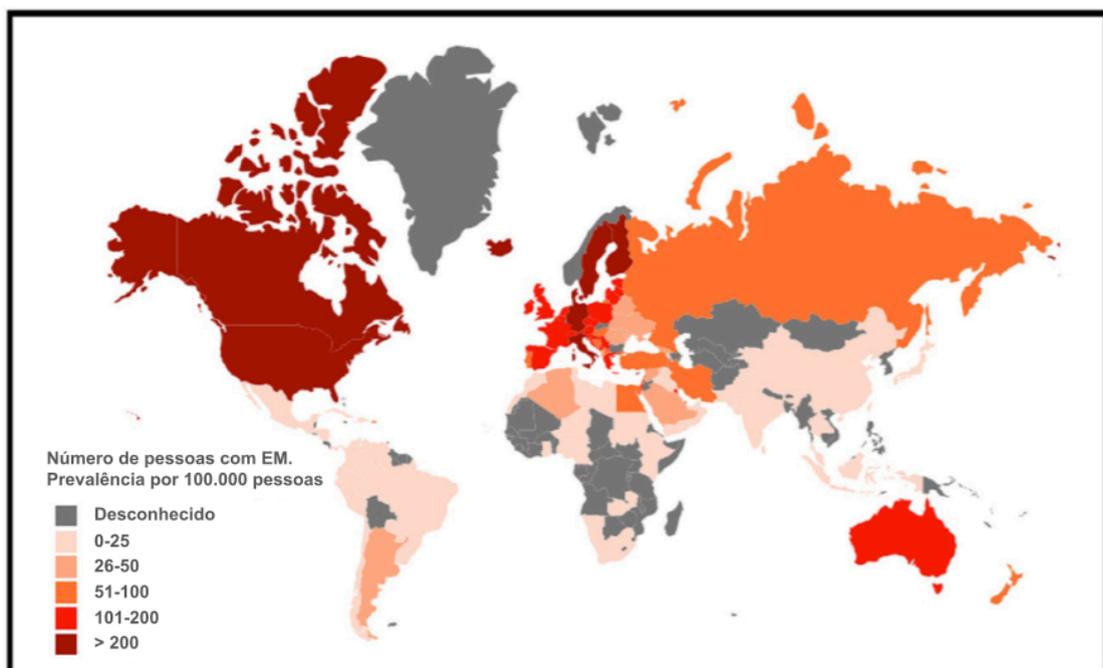
### **2.1 EPIDEMIOLOGIA DA EM**

A esclerose múltipla (EM) é uma condição de saúde crônica, autoimune e neurodegenerativa que atinge 2,8 milhões de pessoas no mundo (WALTON et al.,

2020), sendo a principal causa não traumática de incapacidade neurológica permanente em adultos (MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION, 2020). A prevalência média mundial estimada é de 35,9 casos a cada 100.000 habitantes, podendo chegar até a 142 casos em algumas regiões. Em 2019 foram notificados 59 mil novos casos de EM e 22 mil mortes em escala global, o que sugere uma tendência crescente na incidência e mortalidade dos pacientes nos últimos 30 anos (QIAN et al., 2023). A doença incide predominantemente em jovens adultos com idade média de 32 anos e em mulheres numa proporção de 2 mulheres a cada homem (WALTON et al., 2020).

A distribuição da doença no mundo está correlacionada com o gradiente latitudinal, sendo mais prevalente em regiões mais distantes da linha do Equador. Desta forma, um maior índice de prevalência é observado na América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia (Figura 1) (MOGHADAM et al., 2021; MOGHADDAM et al., 2021).

**Figura 1-** Distribuição global da EM

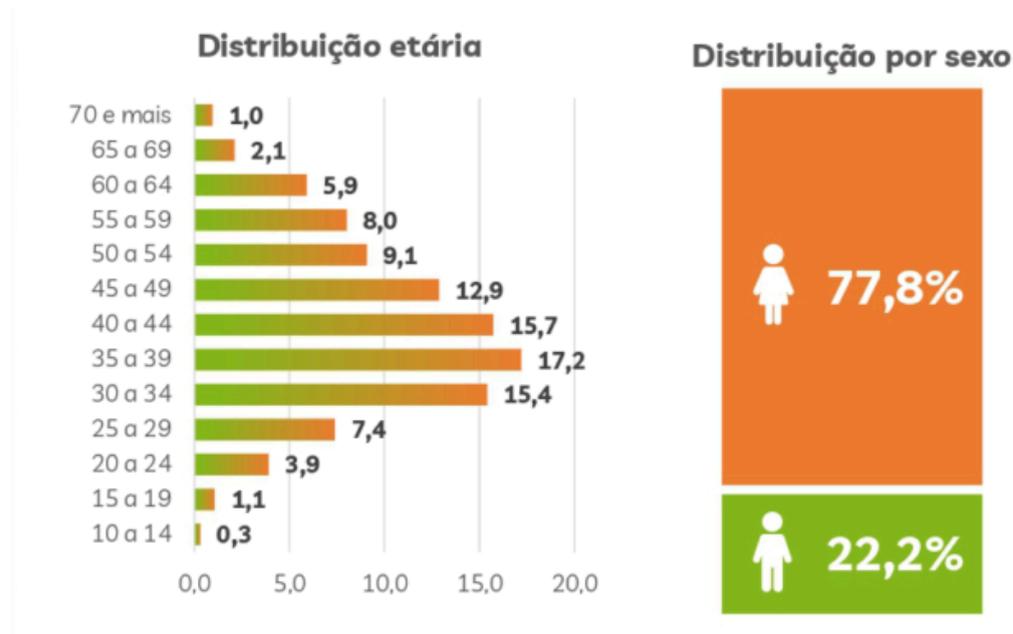


**Fonte:** Adaptado de WALTON, 2020.

No Brasil, a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM) estima que cerca de 40 mil pessoas vivem com a doença no país, sendo observada uma prevalência média de 19 casos por 100.000 habitantes. O perfil de pacientes revela

que mais de 70% dos afetados são do sexo feminino com idade entre 30 e 45 anos (Figura 2) (ABEM, 2024; WALTON et al., 2020). A maior prevalência entre regiões é encontrada no Sul do país (27 por 100.000) e a menor no Nordeste (1,36 por 100.000) (PEREIRA et al., 2015). Em 10 anos, a doença foi responsável por 41 mil internações e mais de 3 mil mortes de acordo com os casos notificados no DATASUS (COELHO et al., 2023). Devido aos escassos dados epidemiológicos sobre esta patologia no país, não foram encontradas estimativas válidas sobre a incidência.

**Figura 2-** Distribuição etária e sexo de pacientes com EM



**Fonte:** Adaptado de ABEM, 2020.

## 2.2 BASES FISIOPATOLÓGICAS

A EM é caracterizada por uma desmielinização focal imunomediada disseminada com maior afecção da substância branca, no entanto observa-se também o comprometimento da substância cinzenta do cérebro. A patologia da substância branca é caracterizada por múltiplos focos inflamatórios acompanhados de infiltrados leucocitários perivasculares, perda de oligodendrócitos, desmielinização com perda axonal variável e cicatrizes astrocíticas reativas. Por outro lado, a substância cinzenta apresenta desmielinização sem uma presença

notável de infiltrados leucocitários (REYNOLDS et al., 2011; LASSMAN; HORSSSEN, 2011).

No estágio inicial da doença a inflamação é a principal responsável pelo aumento do estresse oxidativo que provoca a desmielinização e deterioração da barreira hematoencefálica (BHE), sendo correlacionada com a ocorrência de surtos na EMRR (LUCCHINETTI et al., 2011). A desmielinização é seguida por um período de remielinização que cursa com a remissão de sintomas. Porém, a extensão do reparo da lesão é variável, podendo acumular déficits ao longo do tempo.

Na fase progressiva a inflamação torna-se mais leve e não se correlaciona fortemente com o avanço dos sintomas. Acredita-se que a degeneração progressiva associada à atrofia e acúmulo de incapacidades são os principais responsáveis pela EM progressiva. Ainda assim, o dano oxidativo continua a ser observado por outros mecanismos, como a liberação das reservas de ferro intracelular. Um último estágio de progressão é chamado EM benigna/inativa, porém dados sobre esse estágio são controversos e pouco conhecidos. Ele é alcançado em alguns pacientes que apresentam uma estabilidade nos sintomas físicos da doença por longos anos, podendo ser relacionado com a imunossenescência pois já não são observados focos de inflamação ou oxidação. Ainda que o estado físico não piore nessa fase, o declínio mental ainda pode ser observado, associado a sobreposição de outras condições senis como o Alzheimer (MCFAUL et al., 2021; LASSMAN; HORSSSEN, 2011; REYNOLDS et al., 2011).

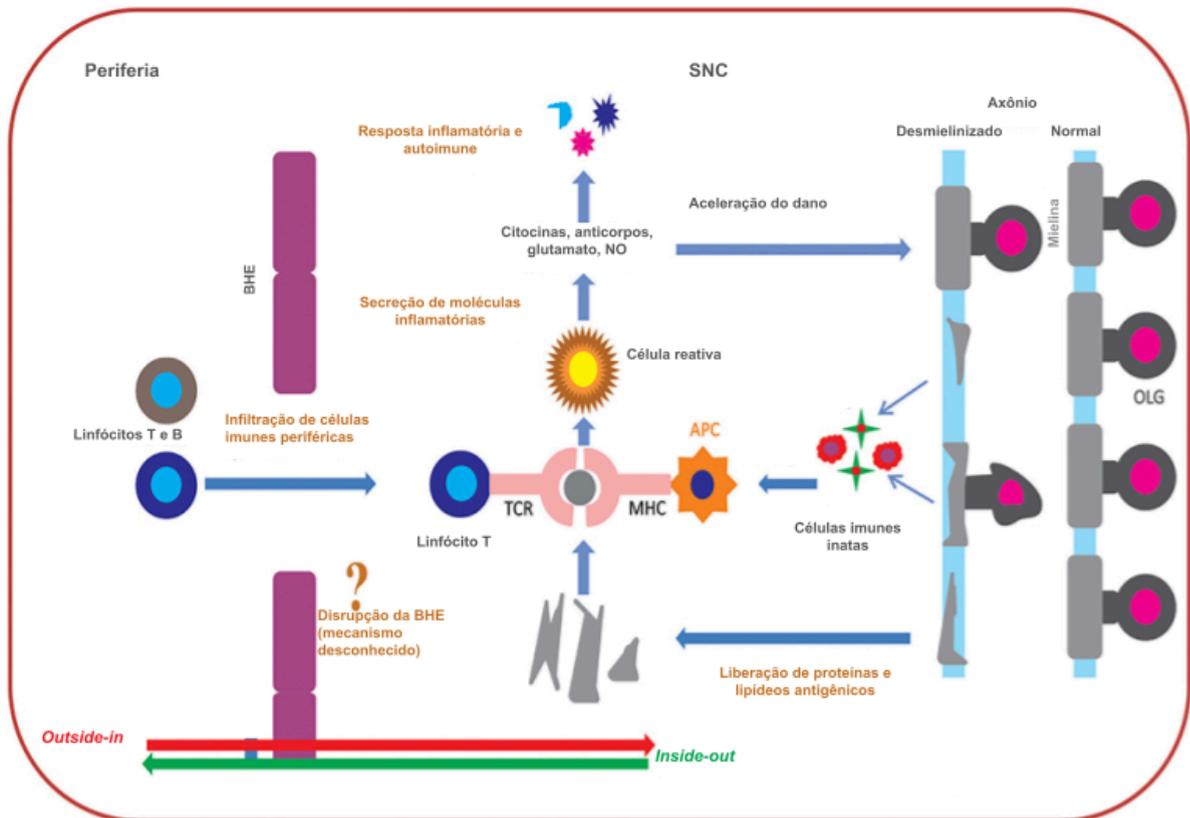
Embora a patogênese da EM não tenha sido totalmente elucidada devido a dificuldade em analisar amostras de tecido cerebral em pacientes vivos, dois mecanismos principais têm sido discutidos para explicar a origem e progressão da doença. O primeiro modelo, denominado “*outside-in*” (de fora para dentro) apoia um início autoimune, enquanto que o modelo “*inside-out*” (de dentro para fora) acredita que a enfermidade inicia-se a partir da degeneração de oligodendrócitos (Figura 3) (SEN et al., 2020; STYS, 2013). Tais mecanismos não são mutuamente exclusivos, o que sugere que ambas as vias são eventos iniciadores da doença em diferentes pacientes, distinguindo-se apenas o momento de início (Titus et al., 2020).

Na primeira hipótese, modelo “*outside-in*”, um fenômeno desconhecido induz a ativação e migração de linfócitos autorreativos através de uma BHE disfuncional, que atacam a bainha de mielina, liberando fragmentos que são fagocitados por células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune inato, como as

micróglias. Essas células por sua vez reativam diferentes linhagens de linfócitos T, os quais exercem suas funções efetoras através da liberação de citocinas. Célula T auxiliares Th1 induzem a liberação da citocina definidora de linhagem IFN- $\gamma$ , além de TNF- $\alpha$ , enquanto células Th17 secretam IL-17, IL-21 e IL-22. Células efetoras CD8+ também contribuem com a produção de IL-17, IFN- $\gamma$  e outras citocinas, além de liberarem grânulos citolíticos. Juntas, essas citocinas induzem citotoxicidade, produção de outros mediadores inflamatórios e ativação de células imuno residentes do sistema nervoso central (SNC), como micróglias, astrócitos e macrófagos, além da liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais agentes exacerbam o processo de neurodegeneração, levando à destruição de oligodendrócitos e da mielina (MALPASS, 2012; BAECHEER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018; SEN et al., 2020; STYS, 2013).

Já o modelo *inside-out* considera que a patogénia tem início no SNC com uma disfunção metabólica dos oligodendrócitos, que sofrem degeneração, liberando fragmentos que induzem a ativação de APCs, inflamação e liberação de citocinas e quimiocinas por células imunes inatas. Tal perturbação resulta em danos a BHE, permitindo a permeabilidade de linfócitos periféricos, os quais são ativados por APCs por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e perpetuam a desmielinização e danos axonais por meio da liberação de mediadores inflamatórios (SEN et al., 2020; STYS, 2013).

**Figura 3-** Mecanismos patogênicos da EM



**Fonte:** Adaptado de SEN, 2020.

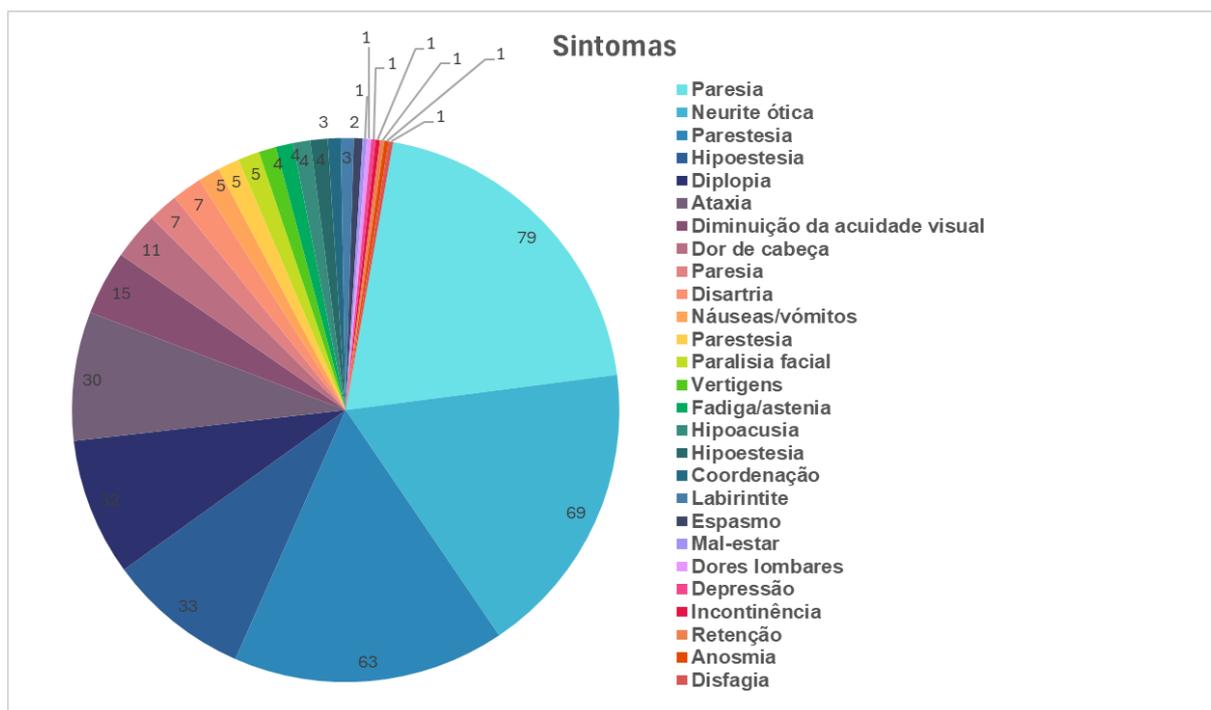
**Notas:** SNC: sistema nervoso central, BHE: barreira hematoencefálica, NO: óxido nítrico, OLG: oligodendrócito, APC: célula apresentadora de antígeno, TCR: receptor de célula T, MHC: complexo principal de histocompatibilidade.

### 2.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas associadas à EM tem grande variabilidade em termos de localização anatômica e intensidade, podendo ser classificadas como motoras, sensoriais, psíquicas, prodrômicas, de equilíbrio e genitourinárias. Mais de 40% dos pacientes sofrem disfunções motoras desde o início dos sintomas, sendo comumente encontrado paraplegia, paraparesia (perda parcial das funções motoras de ambos os membros), monoparesia (perda parcial das funções motoras de um só membro), tetraplegia, quadriparesia (fraqueza nos quatro membros) e hemiparesia (paralisia parcial de um lado do corpo) (GHARAGOZLI et al., 2012). Além disso, um estudo feito no Brasil em indivíduos com diagnóstico confirmado de EM mostrou que um quarto deles apresentaram fraqueza muscular (paresia), estando presente em

todos que tinham sintomas motores. Este mesmo estudo observou que os demais sintomas mais observados nessa população foram neurite óptica, parestesia (sensação de formigamento), hipoestesia (sensação de dormência), diplopia e ataxia (coordenação motora prejudicada), seguidos de diminuição da acuidade visual e dor de cabeça (Figura 4) (CAVENAGHI et al., 2017).

**Figura 4-** Gráfico de frequência absoluta dos sintomas relatados em pacientes com EM



Fonte: Adaptado de CAVENAGHI, 2017.

Embora menos frequentes, outros sintomas evidenciam a natureza imprevisível da doença em comparação a outras condições debilitantes. Dentro de ambientes de cuidados como clínicas de cuidados continuados, pacientes com EM experimentam substancialmente mais dor, úlceras por pressão, dificuldade de deglutição, necessidade de usar cadeira de rodas e suscetibilidade a quedas quando comparado aos que sofrem de Alzheimer, outras demências e demais doenças neurológicas e não neurológicas. Nesse ambiente, esses pacientes também apresentam maior propensão a desenvolverem ansiedade, depressão e uso de medicamentos antidepressivos, ansiolíticos e sedativos (TURCOTTE et al., 2018).

Quando as manifestações clínicas são comparadas entre pacientes idosos com fenótipos EMRR ou EMSP a longo prazo, parece haver uma maior intensidade nos sintomas de pacientes progressivos principalmente no que diz respeito à

velocidade de caminhada e necessidade de auxílio marcha (HUA et al., 2021). Já a comparação de manifestações de acordo com o grupo etário de início da doença não demonstra diferenças notáveis, com exceção de convulsões e sinais cerebelares, os quais ocorrem mais na EM de início precoce (<16 anos) (ASHTARI et al., 2010). Uma coorte sobre a presença de comorbidades em EMRR e EMSP mostra ainda que a dor, doença cardíaca, depressão, hipertensão, dislipidemia e obesidade são as principais comorbidades associadas à EM, sendo a depressão, hipertensão e dor mais frequentes na fase progressiva (HUA et al., 2021).

## 2.4 FATORES DE RISCO

A latitude, bem como a carência de vitamina D, a infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) e o tabagismo são considerados fatores de risco ambientais associados ao surgimento da EM. Acredita-se que a maior latitude está correlacionada a um maior número de casos devido à menor exposição solar nessas regiões e conseqüentemente baixos níveis de vitamina D, que é um fator de risco fortemente relacionado a condições autoimunes (QIAN et al., 2023; MOGHADAM et al., 2021). Por sua vez, a vitamina D se correlaciona à doença devido ao seu efeito supressivo na proliferação de linfócitos B e T e aumento da respostas regulatórias de células T (Treg), o que promove fenótipos tolerogênicos de monócitos e células dendríticas (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018).

O tabagismo aumenta o risco de desenvolvimento de EM em fumantes, além de agravar a progressão da doença em indivíduos expostos ao tabaco tanto de maneira ativa quanto passiva. Aparentemente, o tabaco provoca uma irritação pulmonar que induz a ativação de linfócitos T produtores de IL-17, ocasionando uma inflamação sistêmica (HEDSTRÖM et al., 2011; WU et al., 2023).

Por um longo período acreditou-se que a EM tinha origem viral, fato que permanece sem comprovação científica. Porém, uma importante correlação foi estabelecida entre a infecção pelo EBV e o surgimento da patologia (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018). Uma coorte de 20 anos realizada com mais de 10 milhões de jovens mostrou que 97% dos indivíduos que desenvolveram EM positivaram para o vírus EBV antes de apresentar os primeiros sintomas. Além disso, o mesmo estudo mostrou um risco 35 vezes maior de

desenvolver EM após a infecção pelo EBV quando comparado a outros vírus (BJORNEVIK et al., 2022). Essa correlação pode ser explicada atualmente pelo mimetismo molecular produzido pelo vírus. Cerca de 25% dos pacientes com EM apresentam um anticorpo contra a proteína viral EBNA1, mas que também liga-se firmemente à molécula de adesão GlialCAM, presente no cérebro e medula espinhal, o que ocasiona uma resposta autoimune (LANZ et al., 2022).

Fatores genéticos também parecem exercer um papel na suscetibilidade a EM, evidenciado por uma taxa de concordância em gêmeos monozigóticos de 25% e diferentes taxas de prevalência entre grupos étnicos com ancestrais comuns (BAECHER-ALLAN; KASKOW; WEINER, 2018). Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) presentes em genes do locus HLA-DRA e alelos dos genes IL7RA e IL2RA foram identificados como fatores de risco hereditários para a EM. O papel desses genes na EM pode estar relacionado com a disfunção de células T regulatórias pelo funcionamento incorreto do receptor CD25, impedindo o reconhecimento de linfócitos auto reativos (HAFLER et al., 2007).

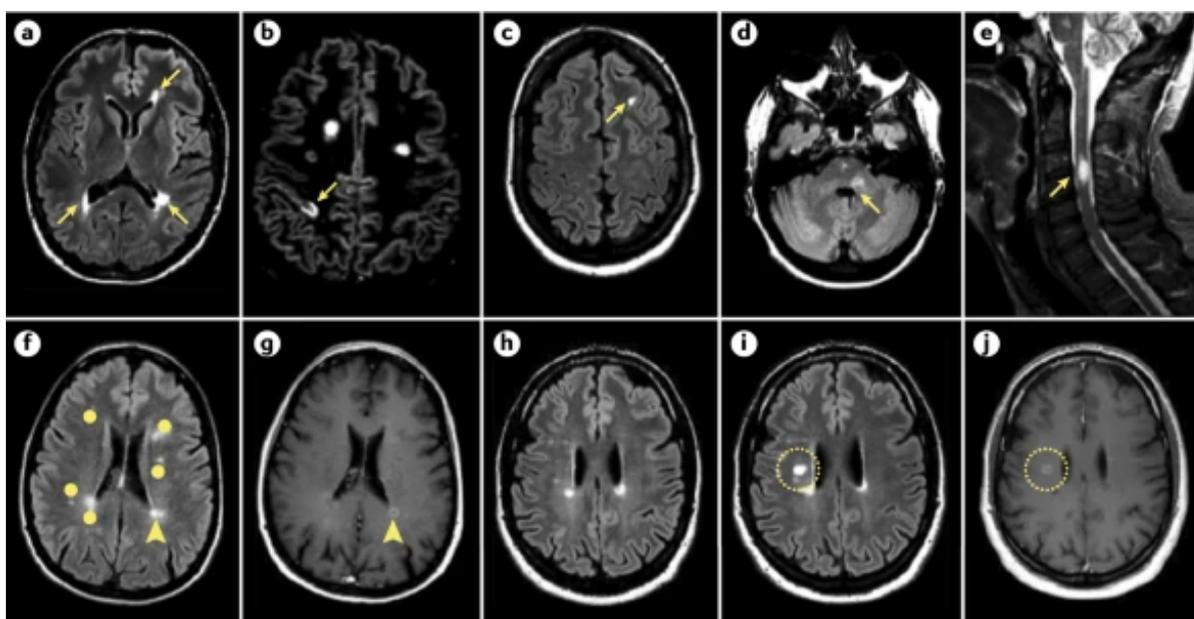
## 2.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da doença é baseado na disseminação espacial e temporal das lesões no cérebro, definido pelos critérios de McDonald. Os critérios incluem avaliações clínicas e paraclínicas, visto que nenhum episódio isolado exclusivamente clínico ou teste de diagnóstico é suficiente para o diagnosticar esta condição. Para um diagnóstico mais assertivo, é observado se existe uma explicação mais plausível para o quadro clínico, além de verificar relatos clínicos objetivos que suportem a existência de lesões separadas no tempo e espaço, exames de imagem cerebral, principalmente a ressonância magnética (RM) e a presença de anticorpos no líquido cefalorraquidiano (LCR). Salvo exceções, a técnica de RM é vista como a mais sensível e específica para detectar lesões características de EM. Por outro lado, a presença de anormalidades no LCR são importantes para apoiar a natureza inflamatória desmielinizante da doença, porém são inespecíficas (MCDONALD et al., 2001; POLMAN et al., 2011; THOMPSON et al., 2018).

A revisão de 2017 dos critérios de McDonald considera que a EM é

clínicamente definida quando: há ocorrência de dois ou mais ataques com pelo menos uma evidência de lesão clínica objetiva, sem necessidade de exames adicionais; há um ataque com evidência clínica de uma ou mais lesões objetivas e disseminação espacial em diferentes locais no cérebro em imagens de RM; há um ataque com evidência de uma ou mais lesões objetivas e disseminação temporal na RM ou presença de bandas oligoclonais no LCR; há um ataque com evidência de uma lesão clínica com disseminação espacial e presença de bandas oligoclonais no LCR. Ataques são definidos como um episódio clínico com duração mínima de 24 horas e com relatos de sintomas típicos de EM. A disseminação espacial evidenciada por RM é caracterizada por uma ou mais lesões hiperintensas em T2 em duas ou mais das quatro áreas do SNC. Já a disseminação temporal é visualizada quando há presença simultânea de lesões com e sem realce de gadolínio em um momento aleatório ou por uma nova lesão hiperintensa a T2 ou com aumento do contraste de gadolínio na RM de seguimento (Figura 5) (THOMPSON et al., 2018).

**Figura 5-** Disseminação espacial e temporal visualizadas por RM em cérebros com EM



**Fonte:** FILIPPI, 2018

**Notas:** Disseminação espacial demonstrada por lesões hiperintensas em T2 em duas ou mais das quatro áreas típicas do sistema nervoso central (A-E, setas). Disseminação temporal demonstrada pela presença simultânea de lesões realçadas na presença de gadolínio (f,g,i) e novas lesões hiperintensas em T2 na RM de seguimento (h, i, j).

Na prática, o diagnóstico da EM é complexo, podendo ser considerado como um diagnóstico de exclusão pois é dado quando não há melhor explicação para as anormalidades clínicas e paraclínicas existentes (MCDONALD et al., 2001). Somado a isso, não há um sinal patognomônico ou biomarcador específico que a diferencie de doenças similares e os critérios de McDonald não foram desenvolvidos para diferenciar a EM de outras condições, mas para identificar uma alta probabilidade de ser acometido por ela uma vez que outros diagnósticos foram considerados improváveis (SOLOMON et al., 2016; THOMPSON et al., 2018).

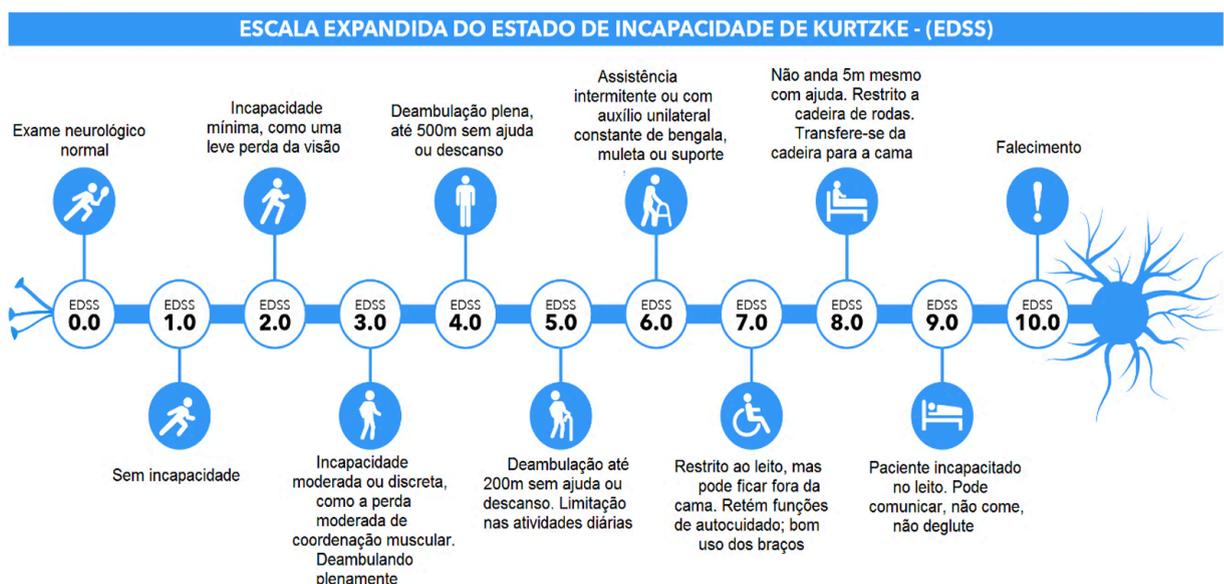
Dificuldades no uso dos critérios de McDonald ocorrem principalmente em países subdesenvolvidos devido a sua má compreensão e aplicação (SOLOMON et al., 2021), bem como devido a grande quantidade de neurologistas sem formação sobre a patologia ou falta de equipamentos para diagnóstico (SOLOMON et al., 2023). Estes fatos resultam em erros como a ocorrência de falso-positivos (ETEMADIFAR; SABETI, 2018) e atraso médio no diagnóstico entre 3 e 10 meses em outros países (KHEDR et al., 2023; ALROUGHANI ET AL., 2012), chegando a 2,8 anos no Brasil (CAVENAGHI et al., 2017).

Quando diagnosticados, os pacientes podem apresentar quatro fenótipos clínicos, de acordo com a atividade e progressão da doença. A CIS é reconhecida como o primeiro episódio clínico do paciente com características inerentes a uma desmielinização inflamatória, mas que ainda não cumpriu critérios de disseminação no tempo por ser um episódio isolado. Manifestações clínicas comuns no primeiro ataque são: neurite óptica unilateral, síndrome supratentorial focal, tronco cerebral focal, síndrome cerebelar e mielopatia parcial. Por si só, a CIS não é capaz de realizar um diagnóstico clinicamente definido de EM, porém o diagnóstico pode ser estabelecido quando associado a achados laboratoriais de imagem e presença de anticorpos (LUBLIN et al., 2014; THOMPSON et al., 2018). A EMPP é definida como um curso com piora contínua desde o princípio, com pequenas flutuações e momentos de platô, mas sem recaídas claramente estabelecidas. Já a EMRR é o fenótipo mais comum e com melhor prognóstico. É caracterizada por episódios de piora aguda da função neurológica seguidos de uma recuperação total ou parcial com poucas sequelas e um período estável entre as recaídas. Pacientes com este curso podem progredir para um fenótipo de EMSP. Nesta fase, as recaídas são inexistentes ou raras e uma evolução gradativa é observada junto a um aumento no escore de incapacidade (LUBLIN; REINGOLD, 1996).

## 2.6 AVALIAÇÃO DA INCAPACIDADE NA DOENÇA

A incapacidade da EM é avaliada através da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS), que descreve o grau de comprometimento funcional de um indivíduo no momento da observação numa escala de 0 a 10, onde “0” indica a ausência de sintomas e “10” a morte por EM (Figura 6). Uma pontuação de até 4 na escala reflete baixo comprometimento em atividades cotidianas e plena capacidade de caminhar em distâncias moderadas. Entre 5 e 6, o indivíduo é capaz de caminhar curtas distâncias, sendo normalmente necessária assistência, e o cumprimento de atividades laborais requer adaptações. Pacientes que apresentam um escore entre 7 e 9 tem grave comprometimento motor, apresentando-se confinados a uma cadeira de rodas ou acamados. Também desenvolvem limitações que impossibilitam parcialmente ou totalmente a realização de cuidados pessoais (KURTZKE, 1983). Embora a escala tenha grande importância, ela se concentra em avaliar principalmente o comprometimento físico, tendo pouca utilidade para avaliar o declínio cognitivo (CREE et al., 2021). Pacientes com EMSP geralmente possuem uma pontuação no EDSS maior que 5, sendo maior que 6 em metade deles, o que indica um comprometimento considerável na qualidade de vida (SCALFARI et al., 2014; ZIEMSEN et al., 2023).

**Figura 6-** Graus de comprometimento funcional de pacientes com EM de acordo com a EDSS



Fonte: SOARES, 2018

## 2.7 PROGRESSÃO DA EMRR PARA EMSP

A EMSP desenvolve-se a partir da evolução da EMRR. Contudo, a ausência de critérios patológicos que caracterizem a fase torna seu diagnóstico dependente do julgamento clínico subjetivo, pois existe uma incerteza se a incapacidade será permanente ou de origem recidiva. Por isso, seu diagnóstico é feito retrospectivamente a partir de dados clínicos que comprovem a existência de incapacidade irreversível acumulada ao longo do tempo, sugerida pela EDSS (ZIEMSEN et al., 2023; LUBLIN et al., 2014). Antes de haver a progressão de fenótipo confirmada, os pacientes passam por uma fase de transição. Essa fase pode ser definida como um período intermediário de vários anos de duração antes que a EMSP seja claramente estabelecida (SAND et al., 2014; KLEITER et al., 2020). A espera por uma confirmação no diagnóstico demora em média 3 anos e na grande maioria dos casos só é alcançada quando o paciente alcança um EDSS acima de 6 (ROJAS et al., 2021; SAND et al., 2014).

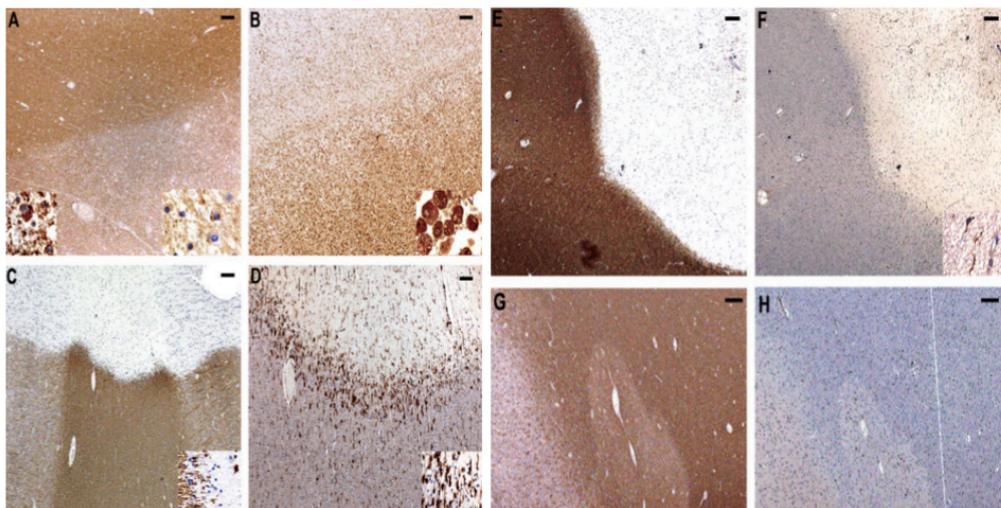
Alguns preditores se correlacionaram com uma transição precoce para EMSP, como ter desde o início da doença uma idade mais avançada, um maior número de recaídas e/ou uma recuperação parcial após recaídas. Além disso, os homens progredem para EMSP em média 6,5 anos mais cedo que as mulheres (SCALFARI et al., 2014; KLEITER et al., 2020). A piora da incapacidade independente do tempo de recaída, uma maior taxa de acúmulo de incapacidade e a ocorrência de mais de um agravamento confirmado de incapacidade aumentam os riscos de progressão para EMSP (CAROTENUTO et al., 2020). O agravamento de alguns sintomas parecem correlacionar-se positivamente com a transição para EMSP, como a piora da deambulação, cognição, equilíbrio, fraqueza muscular, sintomas visuais, sintomas da bexiga e fadiga, no entanto, todos eles são inespecíficos (ZIEMSEN et al., 2020).

É de extrema importância que características únicas da EMSP sejam encontradas a fim de que pacientes com esse fenótipo de beneficiem das novas terapias desenvolvidas para a fase progressiva, como o Siponimod e Ocrelizumab, visto que a doença progressiva não responde a terapias convencionais e expõem os indivíduos a efeitos colaterais e um ônus financeiro considerável (CAROTENUTO et al., 2020).

## 2.8 LESÕES HISTOPATOLÓGICAS NA EMSP

Placas presentes na substância branca do cérebro com EM demonstram cinco padrões de apresentação: lesão ativa, lesão crônica ativa, lesão inativa, lesão remielinizante e substância branca de aparência normal (NAWM) (Figura 7). As lesões ativas são localizadas entre as placas desmielinizadas e a substância branca. A atividade de linfócitos T e B é abundante, principalmente T CD8+. Além disso, há um denso infiltrado de macrófagos contendo em seu interior produtos de degradação da mielina e imunorreativos às principais proteínas da mielina, como MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*), MAG (*myelin-associated glycoprotein*), PLP (*proteolipid protein*) e CNPase (*cyclic nucleotide phosphodiesterase*). A área é caracterizada pela atividade inflamatória e extensa lesão axonal aguda. Lesões crônicas ativas são caracterizadas por um centro sem atividade imunológica rodeado por uma faixa de microglias ativadas. As lesões inativas apresentam níveis acentuadamente menores de células T, mas presença de macrófagos com vacúolos vazios. Essa lesão tem ainda bordas nítidas com poucos macrófagos e micróglias. Por sua vez, as lesões remielinizadas mostram apenas a presença de raros macrófagos, gliose astrocítica e formação de uma nova bainha de mielina ao redor dos axônios (FRISCHER et al. 2009; FRISCHER et al., 2015; BRUCK et al., 1995).

**Figura 7-** Lesões histopatológicas presentes na EM



**Fonte:** Adaptado de FRISCHER, 2015.

**Nota:** Lesões ativa (A, B), crônica ativa (C, D), inativa (E, F) e remielinizante (G, H). A, C, E e G apresentam coloração de imunohistoquímica para PLP. B, D, F foram corados por imunohistoquímica para CD68 em macrófago/micróglio.

Estudos mostram que a EMSP apresenta uma maior carga de lesões, porém menos inflamação é observada. Lesões crônicas ativas aparecem quase exclusivamente na doença progressiva e são inversamente proporcionais à quantidade de lesões remielinizadas (FRISCHER et al., 2015; LUCHETTI et al., 2018). Pacientes com EMSP que ainda apresentam ataques têm um perfil variado de lesões, sendo 33% ativas, 30% inativas, 20% remielinizantes e 17% crônicas ativas. Já os que não apresentam ataques têm em sua maioria lesões inativas (61%), além de 22% de lesões crônicas e raras lesões ativas (8%). Pacientes com mais de 30 anos de diagnóstico geralmente não têm nenhuma lesão ativa. Em contraste, a EMRR é caracterizada pela ausência de lesões crônicas ativas e aproximadamente dois terços de lesões ativas com alta atividade microglial e macrofágica. Enquanto isso, indivíduos assintomáticos possuem predominantemente lesões inativas, o que pode ser explicado pelo fato da neurodegeneração cessar concomitantemente à reação inflamatória (FRISCHER et al., 2015; FRISCHER et al. 2009; LUCHETTI et al., 2018).

## 2.9 BIOLOGIA DE SISTEMAS

O advento da biologia molecular permitiu a geração de diversos dados biológicos, como genomas e propriedades de proteínas, mas essas informações por si só não são suficientes para interpretar seu significado. Por essa razão, tecnologias são necessárias para realizar o monitoramento e processamento do fluxo de informações levando ao seu significado biológico em um sistema (ADEREM, 2005; KITANO, 2002).

Em biologia, um sistema trata-se de uma rede de componentes interconectados e interdependentes com características únicas não observadas nos componentes individualmente (TREWAVAS, 2006). Três propriedades básicas caracterizam os sistemas: a emergência, a robustez e a modularidade. A emergência relaciona-se às características emergentes do sistema, isto é, suas características não podem ser previstas ou compreendidas pela observação isolada das partes que compõem o sistema, mas somente pelo resultado do conjunto de ações e interações dos seus elementos. A robustez diz respeito à estabilidade

fenotípica que possui, ou seja, em meio às perturbações induzidas pelo ambiente, o controle através de feedbacks positivos e negativos dos seus componentes permite que não haja variação no fenótipo final do sistema. Por último, a modularidade se expressa como um conjunto de nós que realizam fortes interações entre si em prol de realizar uma mesma função, o que garante a robustez. Estas interações modulam os elementos do sistema através de mecanismos de ativação, inibição, degradação e modificações estruturais (ADEREM, 2005; KITANO, 2002).

Dessa forma, a biologia de sistemas pode ser definida como uma área de atuação dentro da bioinformática que utiliza métodos computacionais na análise de dados de larga escala, como os dados ômicos. Seu objetivo é construir redes biológicas e modelar interações a fim de prever seu significado biológico emergente. Na prática, o maior número possível de dados biológicos é coletado, integrado e transferido para um banco de dados, onde são armazenados e anotados. A partir daí, programas computacionais inferem as propriedades emergentes do sistema, transferindo-as para programas de visualização que possibilitam a compreensão e interpretação dos dados por humanos (ADEREM, 2005).

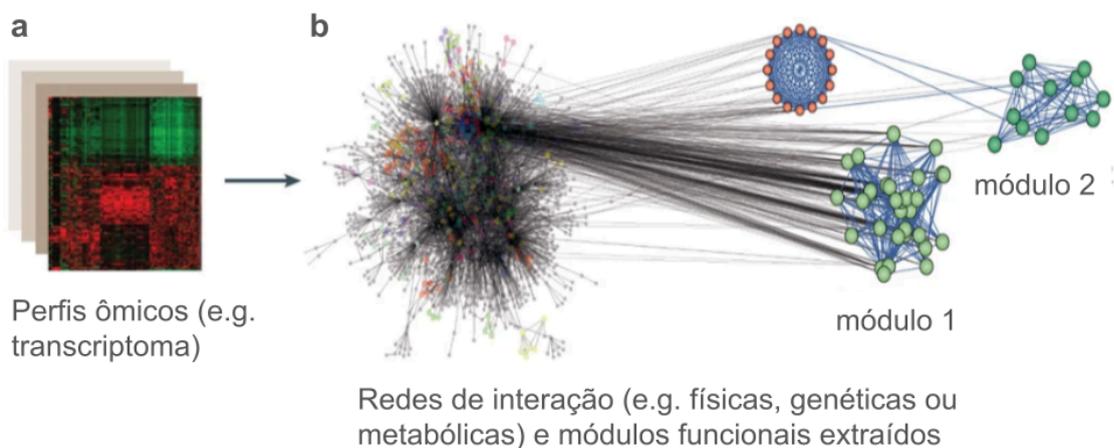
### 2.9.1 Redes de Interação Molecular

Fisiologicamente, a cooperação entre as redes de interação entre moléculas é o que permite o surgimento de diferentes fenótipos celulares e o bom funcionamento dos sistemas biológicos (PANDITRAO et al., 2022). A integração de perfis ômicos com dados de espécies e patologias permite identificar conjuntos de moléculas que participam de uma mesma rede de interação, além de identificar módulos mais interconectados entre si, o que contribui para elucidar a organização funcional e estrutural numa célula (Figura 8) (MITRA et al., 2013).

Em biologia de sistemas, as redes de interação molecular são representadas por nós e arestas. Os nós são a representação de genes, proteínas, enzimas, metabólitos ou fatores de transcrição que participam da rede, enquanto as arestas sinalizam a existência de algum tipo de relação física ou funcional entre as moléculas. A união de nós e arestas formam gráficos topológicos, chamados grafos, que representam visualmente um processo biológico (PANDITRAO et al., 2022). A implementação de interações entre nós numa rede é feita por programas como o

STRING, que usa algoritmos para cruzar as informações fornecidas pelo usuário com bancos de dados e expandir a rede através de uma pontuação de confiança da interação. Essa pontuação baseia-se em dados experimentais, análises de coexpressão, sinais evolutivos em genomas, mineração de texto e ortologia entre organismos (DONCHEVA et al., 2019). Quatro tipos principais de redes de interação são conhecidas: redes de interação proteína-proteína, redes metabólicas, redes de regulação gênica e redes de transdução de sinal (PANDITRAO et al., 2022).

**Figura 8-** Diagrama ilustrativo de redes de interação e módulos funcionais



**Fonte:** Adaptado de MITRA, 2013

**Notas:** a. perfis de dados ômicos servem de base para a extração de redes de interação molecular. b. Extração de módulos funcionais a partir de uma rede de interação molecular. Nós verdes e laranjas representam moléculas, enquanto que as arestas negras e azuis indicam alguma relação entre as moléculas.

### 2.9.2 Enriquecimento Funcional

A análise por enriquecimento funcional é um método capaz de interpretar biologicamente listas de genes encontrados em estudos de alto rendimento. A técnica integra a um conjunto de genes informações funcionais, tais como processos biológicos, vias metabólicas, motivos e complexos proteicos, favorecendo a caracterização do fenótipo estudado (ANDA-JÁUREGUI, 2019; RAUDVERE et al., 2019). O princípio do método baseia-se no fato de um processo biológico ser composto por múltiplos genes, os quais serão expressos diferencialmente numa condição anormal. Sendo assim, após uma análise de enriquecimento, genes envolvidos com o processo biológico ligado ao estado anormal serão expressos

conjuntamente, aumentando as chances de associá-lo ao estado patológico. A validade dos resultados são analisadas estatisticamente ao comparar a chance de ocorrência do processo numa população controle e no grupo de casos (HUANG, SHERMAN, LEMPICKI, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar moléculas candidatas a biomarcadores de diagnóstico a partir da caracterização das vias moleculares e genes desregulados envolvidos na patogênese da EMSP.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar potenciais biomarcadores de diagnóstico na EMSP;
- Caracterizar as vias moleculares em que essas moléculas participam na doença;
- Associar os biomarcadores à patogênese de cada tipo de lesão histopatológica.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DADOS TRANSCRIPTÔMICOS

Através do banco de dados MS Atlas (FRISCH et al., 2020), foram obtidos em outubro de 2020 cinco conjuntos de genes, cada um representando uma lesão (ativa, inativa, crônica ativa, remielinizante e NAWM). O MS Atlas possui dados de transcriptoma obtidos por sequenciamento total de RNA provenientes de 98 amostras *post mortem* de cérebro humano de 10 pacientes com EMSP e 5 indivíduos controle sem doenças neurológicas. Foram incluídos no estudo somente genes com expressão regulada positivamente considerando uma taxa de descoberta falsa (FDR)  $<0.05$ .

### 4.2 DEFINIÇÃO DOS GENES ESPECÍFICOS

A ferramenta online diagrama de Venn (disponível em: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) foi usada para separar os genes de interesse para esse estudo, ou seja, genes superexpressos especificamente em um dos cinco grupos de lesão, visto que ao serem encontrados desregulados em somente uma das lesões, assume-se que tais genes são os responsáveis pela diferença entre os fenótipos. A inexistência de genes específicos em qualquer um dos grupos de lesões analisadas acarretou na sua exclusão da análise de vias.

### 4.3 REDE DE INTERAÇÃO E GRUPOS DE INTERAÇÃO

Redes de interação molecular foram formadas para cada lesão utilizando a ferramenta STRINGApp (DONCHEVA et al., 2019), no software Cytoscape v.3.8.0 (SHANNON et al., 2003). Nesta etapa, ajustou-se o parâmetro 'confidence score' em 0.04. Essa ferramenta só considera genes transcritores de proteínas na formação da rede. Em seguida, o *plug-in* MCODE do Cytoscape foi usado para encontrar regiões densamente conectadas nas redes de interação obtidas, definindo dessa forma os grupos de genes que interagem entre si, ou *clusters*, e possivelmente participam de

uma mesma via biológica. Os parâmetros aplicados no MCODE foram: 'degree cutoff' = 2, 'haircut' = ativo, 'node score cutoff' = 0.2, 'K-Core' = 2 e 'max. depth' = 100. Apenas foram analisados *clusters* com score  $\geq 3$ .

#### 4.4 ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

Usou-se a plataforma g:Profiler (RAUDVERE et al., 2019. Acesso em: <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>) para realizar o enriquecimento de vias para cada grupo dentro das lesões. A fonte de dados na plataforma foi o banco de dados de vias moleculares Reactome. Foi considerado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

#### 4.5 ASSOCIAÇÃO COM OUTRAS DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS

A fim de garantir que os genes selecionados fossem marcadores específicos para a EM, foi verificado nos bancos de dados Allen Brain Map (<https://portal.brain-map.org/>) e Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) se os genes eram diferencialmente expressos também em outras doenças neurodegenerativas. O critério de exclusão usado nesta etapa foi ter a expressão gênica desregulada nas doenças de Alzheimer, Parkinson e/ou Huntington.

#### 4.6 ANÁLISE DAS VIAS

As vias pertencentes aos genes remanescentes foram ranqueadas com base na especificidade (se pertencem a um único tipo de lesão) e maior significância estatística ( $p < 0,05$ ) de modo a explorar os resultados das 3 mais significativas.

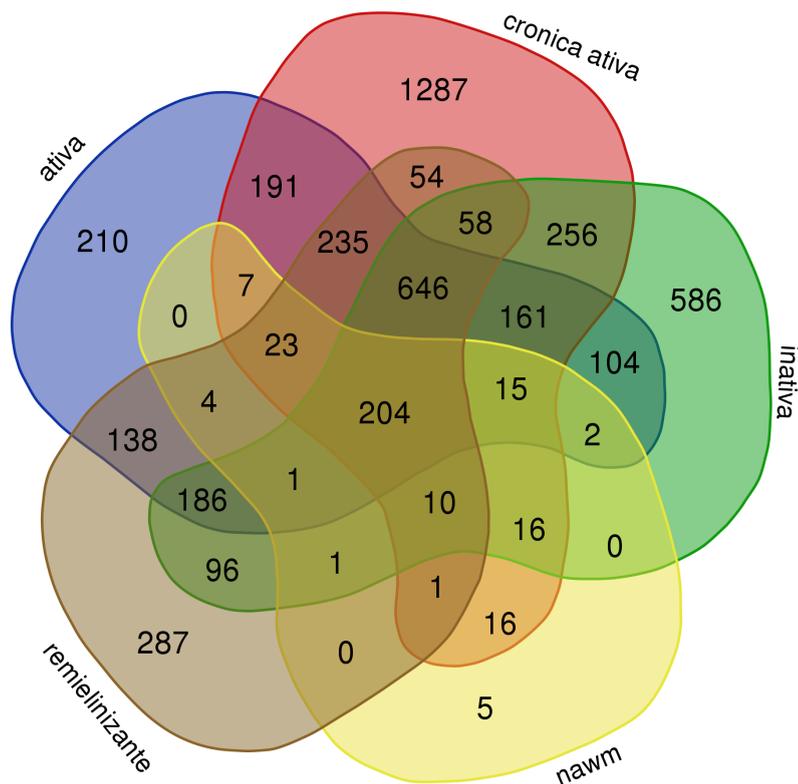
Após a seleção das vias mais importantes de cada lesão, os genes contidos nela tiveram suas funções investigadas através da ontologia e literatura científica a fim de elucidar seus papéis no mapa geral da via. Entende-se como ontologia o conjunto de conceitos que descrevem a função biológica do produto de um gene (THOMAS, 2017). Por fim, os genes pertencentes a essas vias que se adequaram aos critérios de inclusão foram destacados com possíveis biomarcadores para a EM.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 SELEÇÃO DE GENES ESPECÍFICOS

A busca por genes superexpressos no MS Atlas resultou em 4.800 genes desregulados, dos quais 2.425 estavam sobrepostos entre as lesões. Os demais 2.375 genes apresentaram-se exclusivamente em uma das lesões, sendo 1.287 genes na lesão crônica ativa, 586 na lesão inativa, 210 na lesão ativa, 287 na lesão remielinizante e apenas 5 na NAWM (Figura 9). Todas as lesões tiveram um maior número de genes compartilhados com a lesão crônica ativa, com exceção da lesão remielinizante, que teve o padrão de expressão mais similar ao da lesão ativa.

**Figura 9-** Diagrama de Venn indicando o número de genes compartilhados e únicos nas cinco lesões histopatológicas da EMSP

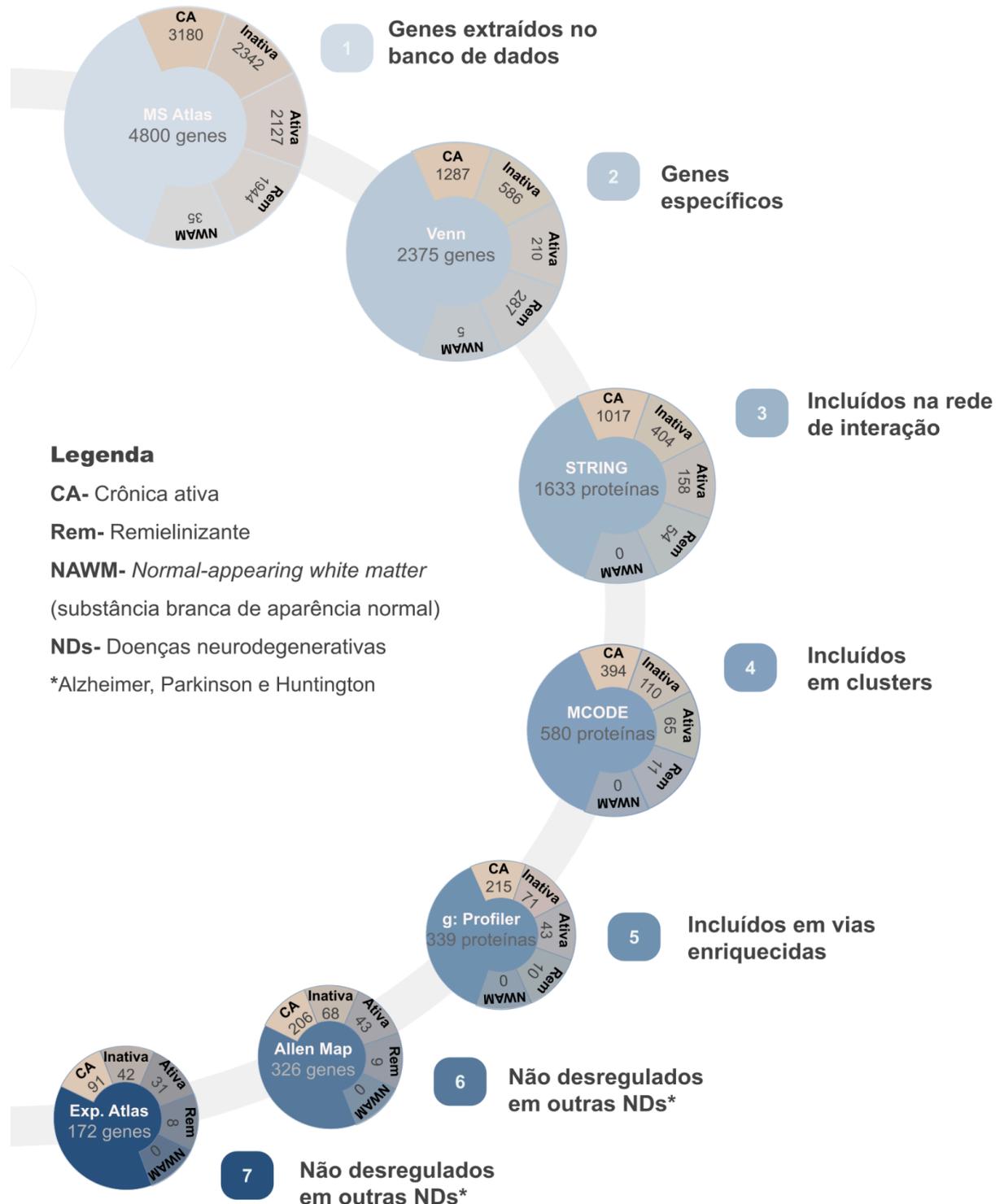


Fonte: autoral.

Genes foram excluídos do estudo devido a fatores como: estar sobreposto entre lesões, não produzir proteína ou não interagir na rede de interação, não participar dos módulos ativos identificados, não participar de nenhuma via

enriquecida ou estar superexpresso em outras doenças neurodegenerativas, não sendo específico para EM. Ao final, apenas 172 genes foram considerados de interesse, o que equivale a 3,6% do número inicial (Figura 10).

**Figura 10-** Diagrama operacional da curadoria de dados feita para seleção de genes candidatos a biomarcadores nos cinco tipos de lesões da EMSP



Fonte: autoral.

É possível notar que mais da metade dos genes finais pertenciam unicamente à lesão crônica ativa. Observa-se também que a lesão remielinizante tem uma perda significativa de genes específicos após formação da rede de interação no STRING, restando apenas 54 de um total de 287 genes, o que denota que a maioria dos seus genes superexpressos não produzem proteínas. De fato, mais de 200 desses genes excluídos produziam transcritos de RNAs não codificantes, como transcritos antisense, snRNAs, lincRNAs e principalmente lncRNAs, o que pode evidenciar um papel importante de mecanismos regulatórios da expressão gênica no desenvolvimento da lesão remielinizante, o qual não foi explorado neste estudo. Ainda, verifica-se que o grupo NAWM foi removido da análise por não conter nenhum gene exclusivo na rede de interação proteína-proteína feita pelo STRING.

No geral, a etapa de formação de *clusters* no MCODE foi a que sofreu uma maior redução no número de genes, sendo uma importante fase de filtração de dados. Junto com a etapa de formação de redes de interação, elas foram essenciais para estabelecer associações entre os genes de modo a cumprir com o objetivo de caracterizar o papel de certas vias nas lesões de EM.

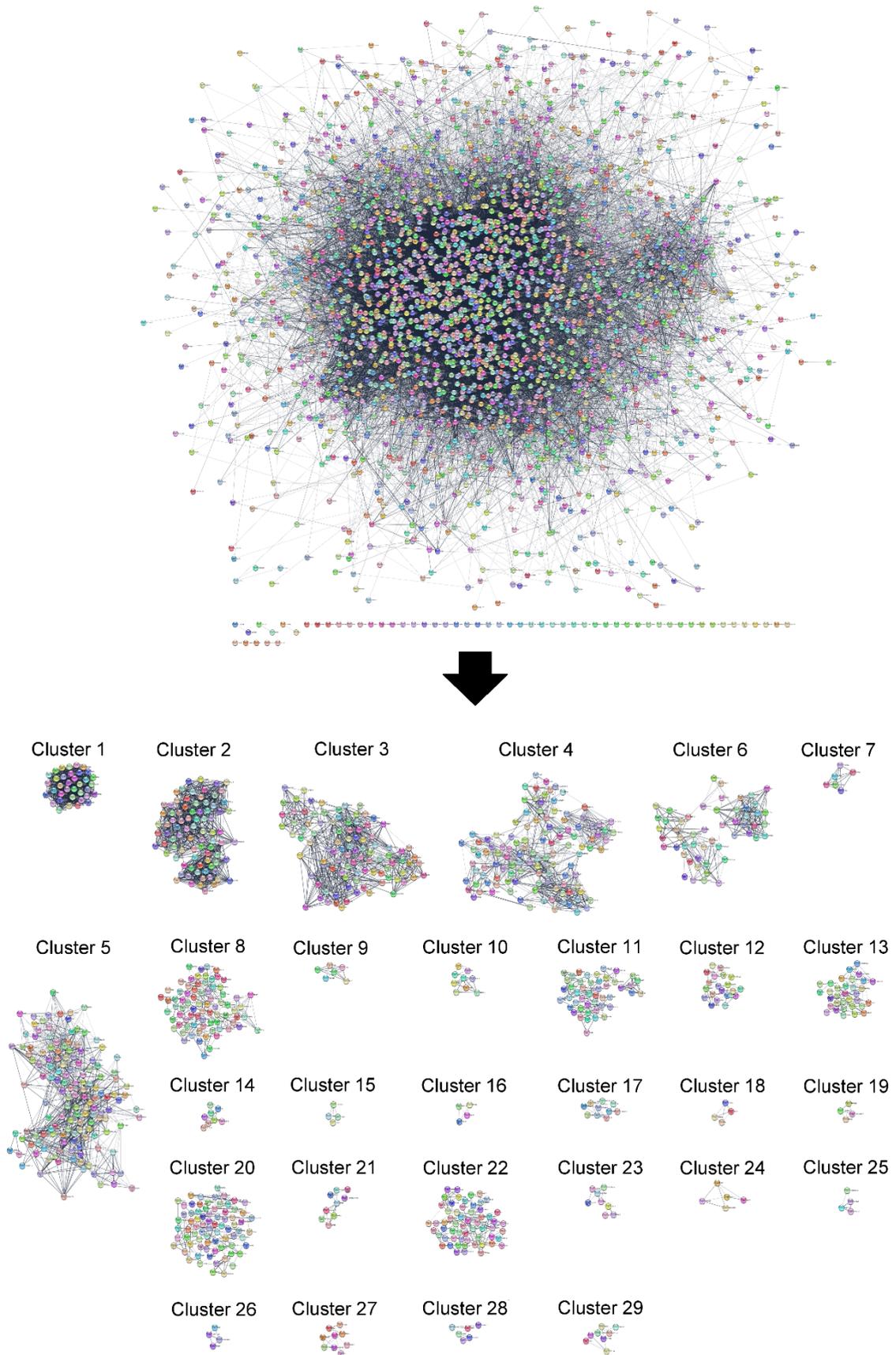
Já na análise de comparação do perfil de superexpressão dos genes selecionados em outras doenças neurodegenerativas, realizada no Allen Brain Map e Expression Atlas, não foi observada grande exclusão de genes. Apesar disso, essa foi uma análise importante para garantir que os genes não compartilhados são potencialmente responsáveis por desencadear o perfil diferencial da neurodegeneração na EM. Essa comparação ocorre apenas com as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington pois compartilham algumas características com a EM, além de serem as mais estudadas, e conseqüentemente seus dados são mais consolidados.

## 5.2 REDES DE INTERAÇÃO MOLECULAR E *CLUSTERS*

Quatro redes de interação foram formadas no STRING, uma para cada lesão. As redes se caracterizaram por uma grande quantidade de interações e proteínas, motivo pelo qual foi necessário extrair *clusters* dentro de cada uma delas, a fim de garantir que realmente existia uma associação forte entre as moléculas de um mesmo *cluster*, aumentando dessa forma a precisão no enriquecimento de vias.

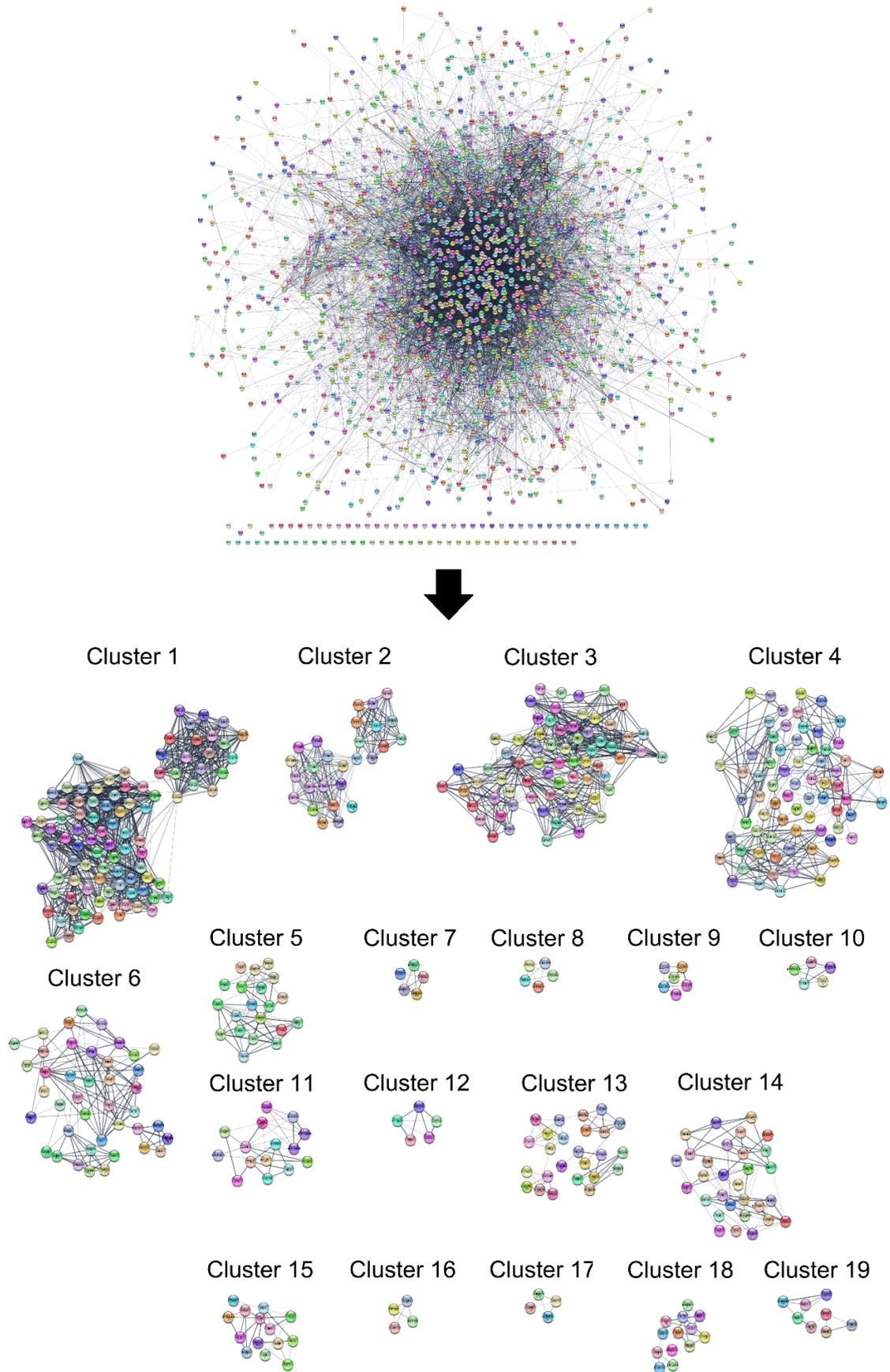
O grupo de dados da lesão crônica ativa formou a maior rede de interação, tendo 2.600 nós e 25.629 arestas. Destes nós, 1.018 representavam proteínas específicas da lesão. Foram encontrados 29 *clusters* com  $\text{score} \geq 3$  (Figura 11). A lesão inativa originou uma rede com 1.817 nós, dos quais 403 eram específicos, e 12.010 arestas. Este grupo conteve 19 *clusters* significativos (Figura 12). De modo similar, a lesão ativa gerou uma rede com 1.773 nós e 14.653 arestas. Ao total, 158 proteínas específicas foram participantes da rede, dos quais 16 *clusters* eram significativos (Figura 13). Por último, a lesão remielinizante apresentou uma rede com 9.141 arestas e 1.427 nós, onde apenas 54 eram exclusivos devido ao alto número de genes não codificantes. Ao todo, sete *clusters* foram encontrados (Figura 14).

**Figura 11-** Rede de interação molecular e *clusters* extraídos da lesão crônica ativa



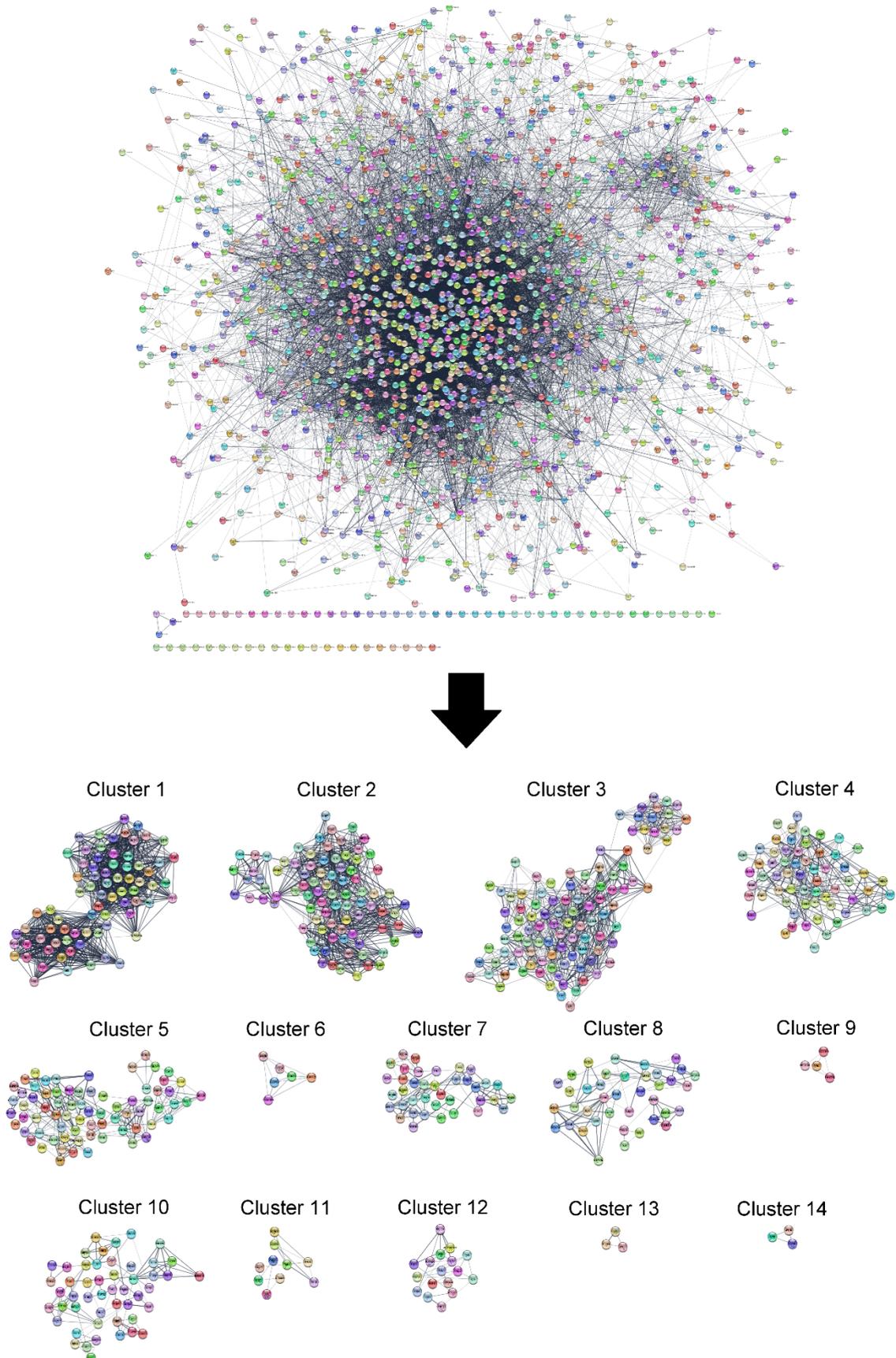
**Fonte:** autoral.

**Figura 12-** Rede de interação molecular e clusters extraídos da lesão inativa



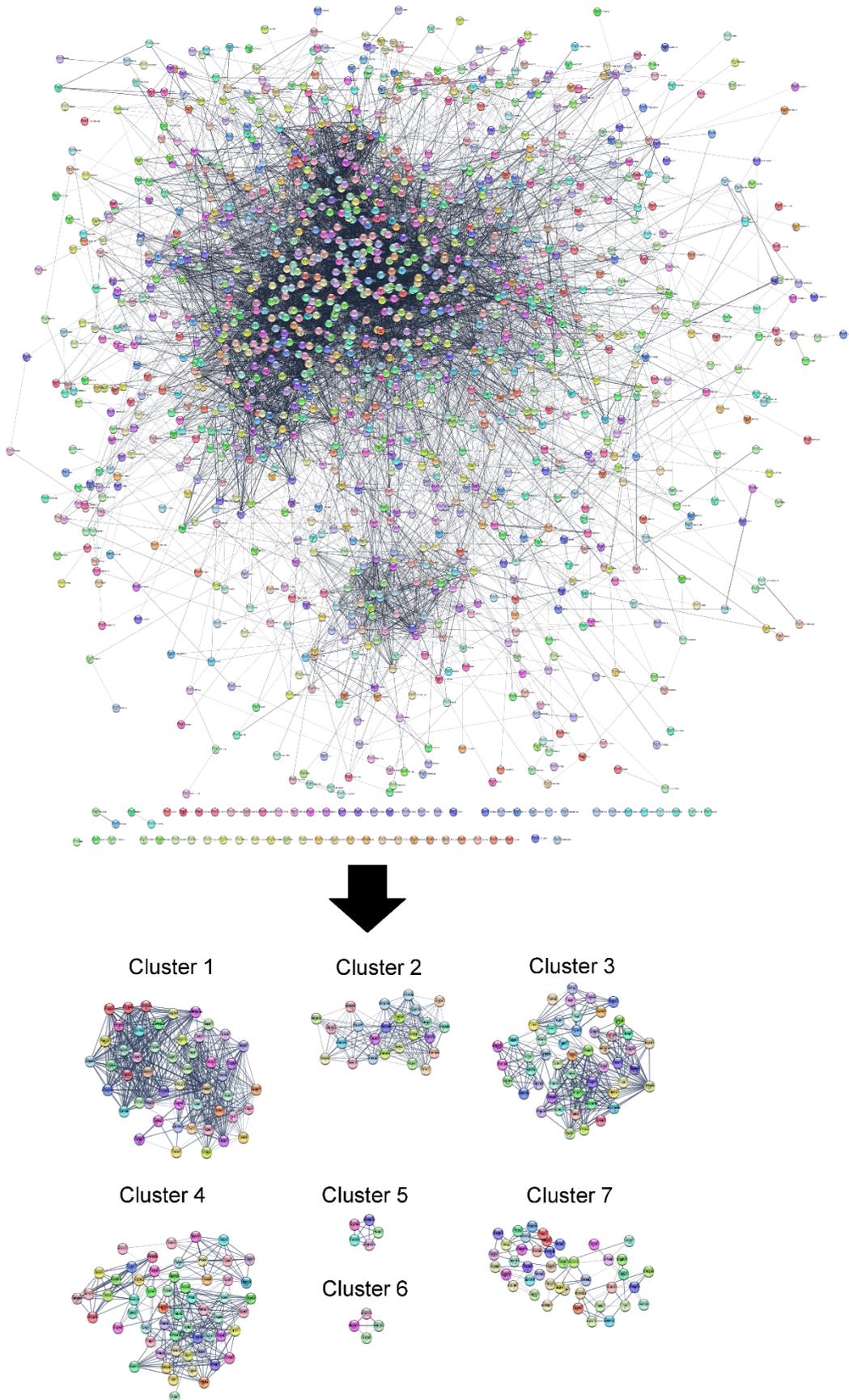
Fonte: autoral.

**Figura 13-** Rede de interação molecular e *clusters* extraídos da lesão ativa



**Fonte:** autoral.

**Figura 14-** Rede de interação molecular e clusters extraídos da lesão remielinizante



Fonte: autoral.

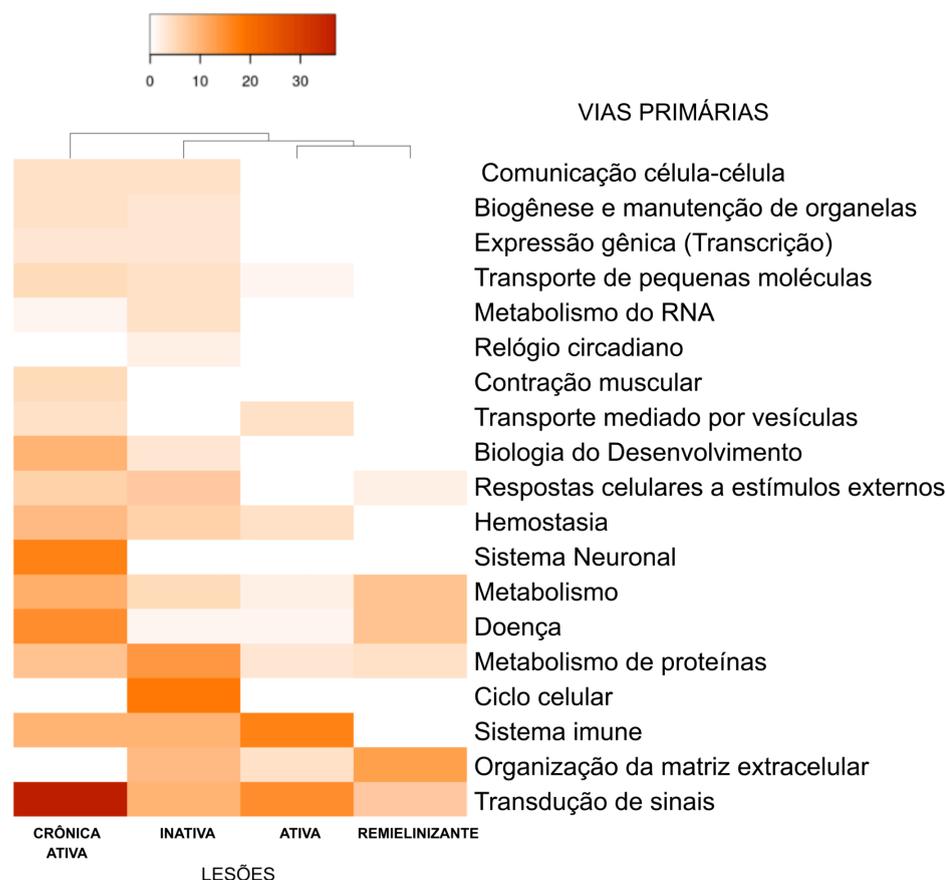
### 5.3 VIAS ENRIQUECIDAS

As lesões crônica ativa, inativa, ativa e remielinizante foram associadas respectivamente a 149, 103, 51 e 41 termos representando vias biológicas. Quando considerado somente o número de vias exclusivas de cada lesão com genes específicos de cada lesão, a contagem foi de 87, 51, 15 e 16 termos, respectivamente.

Devido ao alto número de vias biológicas nas diferentes lesões, num primeiro momento todas foram agrupadas em categorias maiores, aqui chamadas de vias primárias, pois são os níveis mais altos de hierarquia do Reactome. Destas vias primárias, derivam todas as ramificações de vias que foram as vias encontradas diretamente na análise, e aqui serão chamadas de vias secundárias.

Dessa forma, as lesões crônica ativa e inativa continham 16 categorias de vias primárias. A lesão ativa foi associada a 9 vias primárias, enquanto a lesão remielinizante foi associada a 6 vias. Analisando essas informações através de um mapa de calor, é possível visualizar que quatro das 19 vias primárias observadas se sobrepõem em todas as lesões, sendo elas: metabolismo, metabolismo de proteínas, doença e transdução de sinais. As vias primárias “contração muscular” e “sistema neuronal” se associaram somente à lesão crônica ativa, enquanto que “ciclo celular” e “relógio circadiano”, somente à lesão inativa. Além disso, as vias primárias contendo mais termos (vias secundárias) nas lesões crônica ativa, inativa, ativa e remielinizante foram, respectivamente, transdução de sinais (38 termos), ciclo celular (18 termos), sistema imune (17 termos) e organização da matriz extracelular (13 termos) (Figura 15). Um dendograma feito a partir das vias primárias no mapa de calor mostrou ainda uma maior similaridade entre a lesão ativa e remielinizante, corroborando com o perfil de moléculas superexpressas mostrado no diagrama de Venn.

**Figura 15-** Mapa de calor ilustrando a densidade de vias secundárias derivadas das vias primárias em cada lesão da EMSP

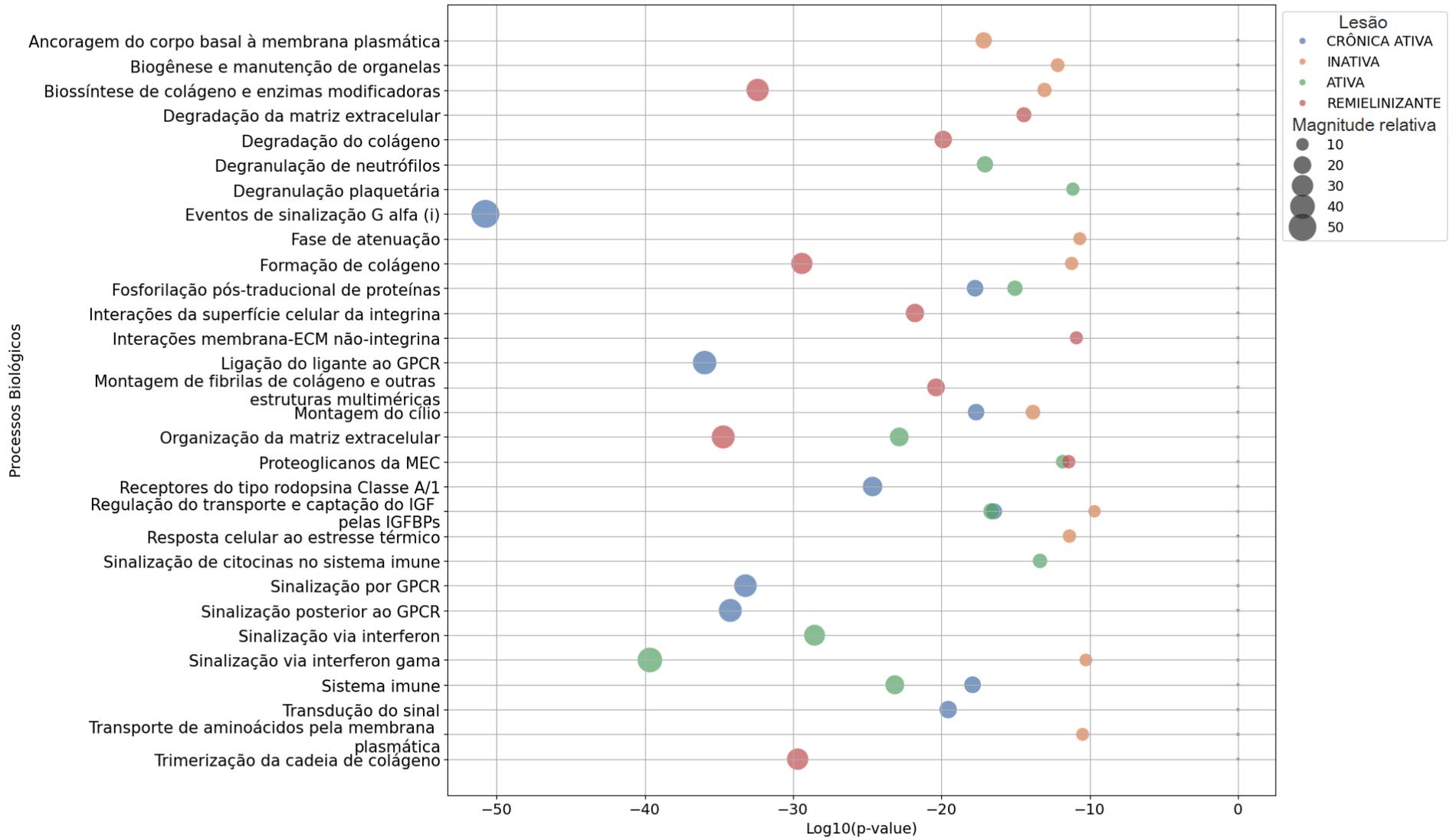


Fonte: autoral, criada a partir de Heatmapper (<http://heatmapper.ca/expression/>).

### 5.3.1 Vias Secundárias Mais Significativas entre Lesões

Embora o estudo tenha focado somente nas principais vias que foram observadas em uma única lesão e continham proteínas específicas, a Figura 16 apresenta o ranking das 10 vias mais significativas por lesão, considerando o p-value. Na lesão crônica ativa, as cinco primeiras vias no topo do ranking indicam relação com a sinalização via receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e nenhuma delas é exclusiva da lesão. A lesão inativa relacionou-se a duas vias associadas à resposta ao estresse térmico, sendo uma delas exclusiva. A lesão ativa teve uma predominância de vias associadas ao sistema imune, principalmente ao interferon. Todas as vias ranqueadas da lesão remielinizante tinham relação direta com a organização ou degradação da organização da matriz extracelular (MEC), a maioria delas estando associadas ao metabolismo do colágeno. A via “interações membrana-MEC não-integrina” foi específica para essa lesão.

**Figura 16-** Gráfico exibindo a distribuição e significância das 10 vias biológicas mais significativas em lesões de EMSP



Fonte: Autoral.

### 5.3.2 Vias Secundárias Específicas da Lesão Crônica Ativa

De 87 vias específicas presentes na lesão ativa, as duas principais vias específicas foram “endocitose mediada por clatrina” e “reconhecimento de carga para endocitose mediada por clatrina”, ambas pertencentes à via primária de transporte mediado por vesícula. Também continham as mesmas proteínas específicas: KIAA0319 e WNT5A (Tabela 1). Já a via “interações das junções aderentes” pertencia ao grupo de comunicação célula-célula. Suas proteínas específicas foram as caderinas CDH9, CDH7 e CDH6.

**Tabela 1-** Ranking das 3 principais vias específicas da lesão crônica ativa

Vias (ID)	p-valor	Genes	Efeito celular da via <sup>(1)</sup>
Endocitose mediada por clatrina (R-HSA-8856828)	1,57e-14	<i>ITSN1, STON2, IL7R, DAB2, CBL, HSPA8, STON1, SNAP91, ITSN2, SYNJ1, AAK1, FNBP1L, ARPC2, KIAA0319, WNT5A, CD4, FZD4, ARRB2</i>	Captação de moléculas através da membrana plasmática
Reconhecimento de carga para endocitose mediada por clatrina (R-HSA-8856825)	2,30e-11	<i>ITSN1, STON2, IL7R, DAB2, CBL, STON1, SNAP91, ITSN2, AAK1, KIAA0319, WNT5A, CD4, FZD4, ARRB2</i>	Captação de moléculas através da membrana plasmática
Interações das junções aderentes (R-HSA-418990)	3,28e-11	<u><i>CDH9, CDH7, CDH8, CDH10, CDH6</i></u>	Adesão celular

**Nota:** <sup>(1)</sup>A descrição de efeito celular foi baseada no Reactome. Genes específicos foram sublinhados.

### 5.3.3 Vias Secundárias Específicas da Lesão Inativa

A lesão inativa apresentou 51 vias exclusivas. Dentre elas, “fase de atenuação” e “Ciclo da chaperona HSP90 para receptores de hormônios esteróides (SHR)” foram as mais significativas e estavam categorizadas entre as vias primárias de resposta celular a estímulos externos. A proteína de choque térmico HSP90AA1 foi superexpressa unicamente nessa lesão e estava associada a outras proteínas de choque térmico. Na terceira via mais importante foi encontrada de forma exclusiva a enzima sialiltransferase ST3GAL2, que transfere grupos sialil a gangliosídeos, os quais parecem regular a expressão de MAG, bem como a estabilidade proteica e regeneração da mielina (Tabela 2).

**Tabela 2-** Ranking das 3 principais vias específicas da lesão inativa

Vias	p-valor	Genes	Efeito celular da via <sup>(1)</sup>
Fase de atenuação (R-HSA-3371568)	2,16e-11	<i>HSPA1L, HSPA1A, DNAJB1, HSF1, HSP90AB1, HSPA8, HSP90AA1, PTGES3</i>	Silenciamento transcricional de HSF1 e inativação da resposta ao choque térmico
Ciclo da chaperona HSP90 para receptores de hormônios esteróides (SHR) (R-HSA-3371497)	1,37e-08	<i>HSPA1L, HSPA1A, DNAJB1, DNAJA1, HSP90AB1, HSPA8, DNAJA4, STIP1, HSP90AA1, PTGES3</i>	Regulação da estabilidade, localização celular e atividade transcricional de SHRs
Glicosilação ligada ao N da asparagina (R-HSA-446203)	3,41e-06	<i>ST3GAL2, MGAT1, B4GALT1, ST8SIA5, ST3GAL1</i>	Aumenta a solubilidade e a estabilidade das proteínas sintetizadas durante o dobramento; sinaliza o transporte de proteínas

**Nota:** <sup>(1)</sup>A descrição de efeito celular foi baseada no Reactome. Genes específicos foram sublinhados.

Além dessas três vias, é válido destacar também a presença da via específica “interações de junção estreita”, que ficou em 4º lugar por uma diferença pequena entre seu p-value (3,66e-06) e o da via “Glicosilação ligada ao N da asparagina” (3,41e-06). Esta via participa na formação de barreiras primárias no espaço paracelular e continha uma proteína de membrana específica da lesão, a claudina (CLDN15), que tem função de regular a permeabilidade endotelial e epitelial.

### 5.3.4 Vias Secundárias Específicas da Lesão Ativa

As categorias de vias primárias das três primeiras vias específicas foram: transdução de sinais e sistema imune. A principal via foi “Sinalização via TRAIL”, que continha o gene de interesse CFLAR, produtor de uma proteína que regula negativamente a apoptose ao inibir o recrutamento da caspase 8 (CASP8). O mesmo gene estava presente em “Sinalização via receptor de morte” (Tabela 3). O único outro gene específico que apareceu entre as três vias mais significativas foi HLA-B, um dos integrantes do MHC classe 1, complexo responsável pelo reconhecimento e apresentação de antígenos a linfócitos T citotóxicos.

**Tabela 3-** Ranking das 3 principais vias específicas da lesão ativa

Vias	p-valor	Genes	Efeito celular da via <sup>(1)</sup>
Sinalização via TRAIL (R-HSA-75158)	1,91e-11	<i>TNFRSF10B, CASP8, TNFRSF10A, TNFSF10, CASP10, <u>CFLAR</u></i>	Indução de apoptose mediada por membros da família TNF
Sinalização via interferon alfa/beta (R-HSA-909733)	2,88e-07	<i>GBP2, OAS3, HLA-F, HLA-E, OAS2, IRF4, IRF5, OAS1, <u>HLA-B</u></i>	Promove a resposta imune, principalmente em resposta a vírus e tumores
Sinalização via receptor de morte (R-HSA-73887)	2,74e-04	<i>VAV1, TNFRSF10B, CASP8, TNFRSF10A, TNFSF10, CASP10, <u>CFLAR</u></i>	Indução da apoptose mediada por membros da família TNF

**Nota:** <sup>(1)</sup>A descrição de efeito celular foi baseada no Reactome. Genes específicos foram sublinhados.

### 5.3.5 Vias Secundárias Específicas da Lesão Remielinizante

As principais vias observadas únicas na lesão remielinizante associaram-se somente às categorias de organização da MEC e metabolismo. Apenas três genes específicos participaram de alguma das vias (Tabela 4).

**Tabela 4-** Ranking das 3 principais vias específicas da lesão remielinizante

Vias	p-valor	Genes	Efeito celular da via <sup>(1)</sup>
Interações membrana-MEC não-integrina (R-HSA-3000171)	1,25e-11	<i>COL5A2, COL5A3, COL5A1, FGF2, PDGFB, <u>COL4A6</u>, THBS1, COL3A1, COL1A1, COL1A2/ LAMA3, SDC2, ITGB5, <u>HSPG2, LAMA5</u></i>	Modulação de receptores citoesqueléticos, integrinas e fatores de crescimento
Síntese de ácidos biliares e sais biliares via 24-hidroxicolesterol (R-HSA-193775)	1,09e-06	<i>AKR1C3, <u>AKR1C1</u>, AKR1C2</i>	Eliminação do excesso de colesterol do cérebro
Síntese de ácidos biliares e sais biliares via 27-hidroxicolesterol (R-HSA-193807)	1,37e-06	<i>AKR1C3, <u>AKR1C1</u>, AKR1C2</i>	Mobilização do colesterol dos fagócitos pulmonares

**Nota:** <sup>(1)</sup>A descrição de efeito celular foi baseada no Reactome. Genes específicos foram sublinhados.

A via “Interações membrana-MEC não-integrina” elencou o primeiro lugar no ranking de significância. Ela continha dois genes específicos, encontrados em *clusters* diferentes: COL4A6, uma subunidade da cadeia de colágeno tipo IV, que é o principal constituinte da membrana basal; e HSPG2, um proteoglicano multidomínio

presente na MEC com funções relacionadas à manutenção da barreira endotelial. Todas as outras vias relacionaram-se ao metabolismo do colesterol e continham o gene AKR1C1, membro da família de redutases de cetonas e aldeídos na produção de álcoois.

## 6 DISCUSSÃO

Embora a EMSP designe clinicamente um único fenótipo, a nível molecular diversos eventos degenerativos e regenerativos ocorrem simultaneamente, sem que haja uma resposta definitiva para a doença. Foi demonstrado que algumas vias e genes estão ligados a um tipo exclusivo de lesão, o que fornece evidências de que diferentes mecanismos patogênicos estão envolvidos no seu desenvolvimento.

Na lesão crônica ativa, a via com maior destaque foi “endocitose mediada por clatrina”, que revelou duas moléculas de interesse: WNT5A e KIAA0319. A WNT5A faz parte da via Wnt não canônica e, quando ligada ao seu receptor FDZ4, pode ser endocitada por intermédio do complexo clatrina AP-2. Após a endocitose, é sugerido que pequenas GTPases são ativadas, como Rho e Rac1, o que promove a reorganização da actina e movimento celular (HABAS; DAWID, 2005; PALAMIDESSI et al., 2008; SATO et al., 2010; VEEMAN et al., 2003; YU et al., 2010). Outro efeito alternativo da reorganização da actina provocada pela sinalização de WNT5A é a fagocitose (MAITI et al., 2012; ZHANG et al., 2013), o que corrobora com a presença de macrófagos e microglias na lesão crônica e pode indicar que a via Wnt não canônica tem um papel na ativação da fagocitose do tecido danificado e potenciais antígenos, dando início a uma resposta crônica.

A via Wnt tem um papel controverso em doenças neurodegenerativas, aparentando ser benéfico para a doença de Alzheimer e Parkinson por estimular sinapses e promover a regeneração de neurônios, porém, maléfico para Huntington por provocar citotoxicidade através do acúmulo de beta-catenina no citoplasma. Na EM, a via canônica poderia ter efeitos protetores ao estimular o aumento de oligodendrócitos mielinizantes, mas ao mesmo tempo a via não canônica foi associada com a ocorrência de dor crônica, sendo WNT5A superexpresso. A via não canônica também parece causar a perda de sinapses e morte neuronal no Alzheimer. No geral, a via canônica é associada a um papel anti-inflamatório, enquanto que a via não canônica tem um papel pró-inflamatório (ANAND et al., 2023; YUAN; SHI; TANG, 2012; SELLERS et al., 2018).

A análise da lesão inativa revelou “fase de atenuação” como a via exclusiva mais significativa. Essa, consiste em uma fase do ciclo das chaperonas onde há diminuição da resposta, através de proteínas de choque térmico, após a recuperação celular ou exposição contínua ao agente agressor. Dentre os 95 genes

identificados no *cluster* 1, oito genes foram ligados à fase de atenuação, em sua maioria proteínas de choque térmico (HSPs), sendo eles: HSP90AA1, HSP90AB1, PTGES3, HSF1, DNAJB1, HSPA8, HSPA1A e HSPA1L. O único gene diferencial da via citada foi HSP90AA1 (HSP90), uma chaperona induzida por estresse que atua promovendo o dobramento de proteínas e a integridade estrutural, além de regular negativamente moléculas envolvidas no controle do ciclo celular, como HSF1, um fator de transcrição de HSPs durante estímulos estressores (PICARD, 2002; ZOU et al., 1998). Na ausência de estresse, sua forma ativa é dissociada por co-chaperonas, como DNAJB1 e proteínas da família HSP70 (como HSPA1A, HSPA1L e HSPA8), passando a manter uma forma inativa ligada a um complexo multichaperonas, formado por HSP90 (presumivelmente HSP90AA1 e HSP90AB1), imunofilina e PTGES3 (KMIIECIK et al., 2020; GUO et al., 2001). Foi sugerido que o HSP90 também poderia remover diretamente trímeros de HSF1 dos elementos de choque térmico (HSE) no DNA, tendo uma função não redundante na inibição de HSF1, o que às vezes pode ocasionar uma resposta ineficaz ao estresse (KIJIMA et al., 2018; ZOU et al., 1998; MARUNOUCHI, 2013). Por sua vez, a diminuição de HSF1 suprime a produção de HSPs, contribuindo com o envelhecimento celular e o desenvolvimento de patologias correlatas (GOMEZ, 2021).

Assim, a resposta celular na lesão inativa, através da "fase de atenuação", sugere uma resposta anterior ao estresse visando restaurar as funções celulares, sendo interrompida pela ação de HSP90 sobre HSF1. HSP90 pode estar prevenindo uma resposta eficaz diante de novos estímulos nocivos, o que indicaria uma futura recaída para uma lesão ativa. De fato, outra análise computacional associou HSP90 a uma via envolvida na etiopatogênese da EM (MAMMANA et al., 2018). Além disso, a regulação positiva de HSP90AA1 em oligodendrócitos e neurônios nas lesões de EM numa análise de trajetória pseudotemporal foi associada ao longo do tempo com a regulação positiva da resposta ao choque térmico, e com vias de estresse e morte celular (SCHIRMER et al., 2019). HSP90AA1 também apresentou uma alta expressão em pacientes com EM apresentando o haplótipo de risco HLA-DRB1\*15:01 e alta expansão clonal de células B (MIKAMI; LEVY, 2024). Logo, a presença da resposta ao choque térmico apenas por chaperonas não garante que a lesão permanecerá inativa, sendo necessário investigar fatores adicionais.

A lesão ativa foi associada predominantemente com eventos do sistema imunológico, o que corrobora com um ambiente onde se observa inflamação,

infiltração e atividade de células imunes. Entre as vias exclusivas ligadas a essa lesão, a mais significativa foi a sinalização via TRAIL, uma via indutora da apoptose. A via inicia-se com a ligação de TNFSF10 (TRAIL) aos receptores TNFRSF10A ou TNFRSF10B, que se trimerizam e recrutam FADD, o que leva posteriormente a ativação da caspase 8 (CASP8) e de mecanismos de morte celular (CHAUDHARY et al., 1997). Com exceção de FADD, todas as proteínas citadas foram encontradas superexpressas na lesão ativa. No entanto, além delas houve também a superexpressão da proteína CFLAR, única específica da lesão pertencente a essa via. Ao contrário das demais, a função de CFLAR quando superexpressa é inibir a apoptose mediada por Fas (CD95) ao bloquear o recrutamento e processamento de CASP8 (SCAFFIDI et al., 1999).

Estudos relatam que CFLAR é regulada positivamente em linfócitos T e B do sangue periférico de pacientes com EM clinicamente ativa, sendo notavelmente mais expressa em infiltrados linfocitários no LCR desses pacientes quando em comparação com controles e outras doenças neuroinflamatórias e relacionando-se com o número de recaídas clínicas (GOMES et al., 2003; SEIDI; HARIEF, 2002; SEMRA et al., 2001; SHARIEF, 2000). Além disso, mesmo com a superexpressão de genes pertencentes à via apoptótica mediada por Fas, a apoptose celular nessas células não ocorreu, o que correlaciona a superexpressão de CFLAR a um mecanismo de resistência a apoptose (GOMES et al., 2003; SEIDI; SHARIEF, 2002). Uma associação interessante também foi descrita entre a resistência a apoptose e regulação positiva de CFLAR em linhagens celulares de linfoma de Burkitt positivas para EBV, o que poderia explicar parcialmente a alta associação da infecção por EBV com o desenvolvimento da EM (TEPER; SELDIN, 1999). Portanto, isso indica que CFLAR pode desempenhar um papel crucial na progressão das lesões ativas da EM ao prolongar a sobrevivência de linfócitos autorreativos patogênicos, podendo ser útil como um biomarcador.

Em investigações mais recentes, CFLAR aparece desregulado em ratos com encefalomielite experimental autoimune (EAE) no primeiro pico da doença e reaparece em sua fase crônica, sendo associado principalmente a via de formação do tecido linfóide (HAMANO et al., 2024). Durante a EAE em roedores e EM em humanos, CASP8 e CFLAR também estiveram superexpressos em células mielóides, sobretudo em micróglia macrófagos, associando-se à desmielinização e dano axonal (KIM et al., 2022). Uma metanálise com dados de microarray em

doenças associadas ao acúmulo de proteínas mal enoveladas, como o Alzheimer, a demência com corpos de Lewy e a demência frontotemporal, CFLAR esteve incluído numa assinatura de genes pan-neurodegenerativos por sua expressão aumentada em micróglia (NOORI et al., 2021).

Na lesão remielinizante, “Interações membrana-MEC não-integrina” foi a via biológica diferencial mais significativa. Dois genes, HSPG2 e COL4A6, foram exclusivos para a lesão nessa via e estavam relacionados a diferentes *clusters*. HSPG2 estava associado a LAMA3, SDC2, ITGB5 e LAMA5, enquanto COL4A6 estava associado a COL5A2, COL5A3, COL5A1, FGF2, PDGFB, THBS1, COL3A1, COL1A1 e COL1A2. Em um estudo anterior, HSPG2 também foi a principal proteína superexpressa em lesões remielinizantes precoces de camundongos tratados com cuprizona (CPZ), associando-se ao processo de desenvolvimento do sistema nervoso na subcategoria de mielinização (SZILAGYI et al., 2020). Já COL4A6 foi uma das proteínas diminuídas na via de interação membrana-MEC em ratos com Alzheimer, o que ocasionou a interrupção da neurogênese compensatória e progressão da neurodegeneração (RUDNITSKAYA et al., 2019).

HSPG2, também conhecido como perlecan, é um proteoglicano multi-domínio com funções na adesão celular, crescimento e manutenção da membrana basal, podendo promover atividade de crescimento durante o desenvolvimento e reparo (MURDOCH et al., 1992). Junto a LAMA3/5, SDC2 e ITGB5, participa de funções como suporte estrutural, adesão celular, regulação do crescimento e manutenção da homeostase no tecido nervoso (MELROSE et al., 2021). HSPG2 foi superexpresso em lesões remielinizantes de cérebros de roedores após AVC, sendo associado a uma melhora na morfologia dos neurônios e na função motora quando recebiam aplicação de um dos seus domínios (LEE et al., 2011; ROBERTS et al., 2012). Em humanos, é superexpresso em córneas humanas lesionadas, participando da regeneração da membrana basal (TORRICELLI et al., 2015). A perda desse proteoglicano aumenta a permeabilidade da membrana, o que pode estar associado a uma função de estabelecer e patrulhar as fronteiras do tecido, como a BHE (HASSEL et al., 1980; FARACH-CARSON et al., 2014). Embora não existam estudos provando o papel neuroprotetor de HSPG2 na EM, a manutenção da estabilidade da BHE e a indução de crescimento e reparo cerebral podem possivelmente promover efeitos benéficos nesta patologia.

No segundo *cluster*, uma das proteínas superexpressas foi o fator de

crescimento PDGFB, que participa no recrutamento de pericitos para os vasos do SNC. Os pericitos são essenciais para cobrir as células endoteliais no SNC desde a embriogênese. Ele participa na formação da BHE e inibe moléculas que aumentam a permeabilidade vascular, o que bloqueia a invasão de células imunes no SNC. Além disso, os pericitos também expressam altos níveis de colágenos, como COL1A1, COL1A2 e COL3A1, o que poderia explicar a expressão aumentada nessa via (ZHANG et al., 2014). Os colágenos são importantes componentes da MEC e seus peptídeos derivados da clivagem participam de processos como desenvolvimento e reparo tecidual (RICARD-BLUM, 2011). COL4A6, o único específico da lesão entre eles, já foi associado com a integridade da membrana basal e com a remielinização de cérebros de camundongos lesionados com CPZ (TAKEUCHI et al., 2015; ROBINSON et al., 2020). Portanto, uma quantidade significativa de moléculas superexpressas nessa via relacionam-se a um papel protetor na manutenção da BHE em lesões remielinizantes. Mecanismos moleculares e celulares parecem convergir em uma resposta contra a neuroinflamação, onde pericitos induzidos por fatores como PDGFB promovem proteção aumentada da BHE enquanto componentes da MEC previnem a infiltração de linfócitos patogênicos e estimulam o reparo tecidual.

Estes dados contribuem para uma maior compreensão dos mecanismos patogênicos envolvidos na EMSP e exploram a utilidade de alguns genes na caracterização desse fenótipo clínico, propondo seu uso como biomarcadores de diagnóstico. Apesar disso, outros estudos são necessários para confirmar as hipóteses sugeridas, visto que estudos computacionais têm acesso limitado a dados da vida pregressa dos indivíduos doadores, o que pode influenciar na expressão gênica.

## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo caracterizou diferentes perfis moleculares envolvidos na patogênese das lesões histopatológicas da EMSP, dentre os quais eventos imunológicos são os principais envolvidos na patogênese de lesões ativas na doença. No entanto, observou-se outros fatores associados com a continuidade da neurodegeneração, como a inibição da morte celular programada em linfócitos patogênicos e a atenuação da resposta ao estresse celular. Além disso, foi demonstrado que a fase progressiva da EM também apresenta sinais de remielinização e reparo do tecido cerebral, ainda que de forma limitada em lesões remielinizantes e pouco eficaz para reverter o quadro patológico geral. Testes experimentais devem ser realizados para validar o potencial dos genes WNT5A, HSP90AA1, CFLAR, HSPG2 e COL4A6 como biomarcadores na EMSP, visto que refletem diferentes microambientes que coexistem neste fenótipo.

## REFERÊNCIAS

- ABEM. **O que é Esclerose Múltipla (EM)**. Disponível em: <<https://www.abem.org.br/esclerose-multipla/o-que-e-esclerose-multipla/>>. Acesso em: 03 jun 2024.
- ADEREM, A. Systems Biology: Its Practice and Challenges. **Cell**, v. 121, n. 4, p. 511–513, maio 2005.
- ALROUGHANI, R. et al. Predictors of Conversion to Multiple Sclerosis in Patients with Clinical Isolated Syndrome Using the 2010 Revised McDonald Criteria. **ISRN Neurology**, v. 2012, p. 1–6, 1 nov. 2012.
- ANAND, A. A. et al. The Molecular Basis of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathways in Neurodegenerative Diseases. **International journal of cell biology**, v. 2023, p. 9296092, 2023.
- ASHTARI, F. et al. Does early-onset multiple sclerosis differ from adult-onset form in Iranian people. **Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 94–9, mar. 2010.
- BAECHER-ALLAN, C.; KASKOW, B. J.; WEINER, H. L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. **Neuron**, v. 97, n. 4, p. 742–768, fev. 2018.
- BJORNEVIK, K. et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. **Science**, v. 375, n. 6578, p. 296–301, 21 jan. 2022.
- BRÜCK, W. et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 5, p. 788–796, 8 nov. 1995.
- CAROTENUTO, A. et al. Unraveling diagnostic uncertainty in transition phase from relapsing-remitting to secondary progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 43, p. 102211, ago. 2020.
- CAVENAGHI, V. B. et al. Characterization of the first symptoms of multiple sclerosis in a Brazilian center: cross-sectional study. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 135, n. 3, p. 222–225, jun. 2017.
- CHAUDHARY, P. M. et al. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. **Immunity**, v. 7, n. 6, p. 821–30, dez. 1997.
- COELHO, V. B. C. P. et al. Análise dos aspectos epidemiológicos da Esclerose Múltipla no Brasil durante o período de 2012 a 2022. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 27513–27527, 11 nov. 2023.
- CONFAVREUX, C.; VUKUSIC, S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. **Brain**, v. 129, n. 3, p. 606–616, 1 mar. 2006.

CREE, B. A. C. et al. Secondary Progressive Multiple Sclerosis. **Neurology**, v. 97, n. 8, p. 378–388, 24 ago. 2021.

DA GAMA PEREIRA, A. B. C. N. et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 4, n. 6, p. 572–579, nov. 2015.

DAVID A. HAFLER, M.D., ALASTAIR COMPSTON, F.MED.SCI., PH.D., STEPHEN SAWCER, M.B., CH.B., PH.D., ERIC S. LANDER, PH.D., MARK J. DALY, PH.D., PHILIP L. DE JAGER, M.D., PH.D., PAUL I.W. DE BAKKER, PH.D., STACEY B. GABRIEL, PH.D., DANIEL B. MIREL, PH.D., ADR, M. D. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 9, p. 851–862, 30 ago. 2007.

DE ANDA-JÁUREGUI, G. Guideline for comparing functional enrichment of biological network modular structures. **Applied Network Science**, v. 4, n. 1, p. 13, 18 dez. 2019.

DONCHEVA, N. T. et al. Cytoscape StringApp: Network Analysis and Visualization of Proteomics Data. **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 2, p. 623–632, 1 fev. 2019.

ELKJAER, M. L. et al. Molecular signature of different lesion types in the brain white matter of patients with progressive multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 7, n. 1, p. 205, 11 dez. 2019.

ETEMADIFAR, M.; SABETI, F. Applying the 2017 McDonald diagnostic criteria for multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 6, p. 497, jun. 2018.

FARACH-CARSON, M. C. et al. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. **Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 34, p. 64–79, fev. 2014.

FILIPPI, M. et al. Multiple sclerosis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 43, 8 nov. 2018.

FRISCH, T. et al. Multiple Sclerosis Atlas: A Molecular Map of Brain Lesion Stages in Progressive Multiple Sclerosis. **Network and Systems Medicine**, v. 3, n. 1, p. 122–129, 1 ago. 2020.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1175–1189, maio 2009.

FRISCHER, J. M. et al. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 5, p. 710–721, 24 nov. 2015.

GHARAGOZLI, K. et al. Frequency distribution of the first clinical symptoms in the Iranian population with multiple sclerosis. **Iranian journal of neurology**, v. 11, n. 3, p. 118–20, 2012.

GOMES, A. C. et al. Upregulation of the apoptosis regulators cFLIP, CD95 and CD95 ligand in peripheral blood mononuclear cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 135, n. 1–2, p. 126–34, fev. 2003.

GOMEZ, C. R. Role of heat shock proteins in aging and chronic inflammatory diseases. **GeroScience**, v. 43, p. 2515–2532, 13 abr. 2021.

GUO, Y. et al. Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 49, p. 45791–9, 7 dez. 2001.

HABAS, R.; DAWID, I. B. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? **Journal of biology**, v. 4, n. 1, p. 2, 2005.

HAMANO, S. et al. Characterization of pathological stages in a mouse model of progressive multiple sclerosis. **Neuroscience research**, v. 204, p. 46–57, jul. 2024.

HASSELL, J. R. et al. Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 8, p. 4494–8, ago. 1980.

HEDSTRÖM, A. et al. Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 17, n. 7, p. 788–793, 3 jul. 2011.

HUA, L. H. et al. Clinical characteristics of a large multi-center cohort of people with multiple sclerosis over age 60. **Multiple sclerosis and related disorders**, v. 47, p. 102637, jan. 2021.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 18 jan. 2009.

KATZ SAND, I. et al. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 12, p. 1654–1657, 3 out. 2014.

KAZEMI MOGHADAM, V. et al. Association of the global distribution of multiple sclerosis with ultraviolet radiation and air pollution: an ecological study based on GBD data. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 14, p. 17802–17811, 5 abr. 2021.

KHEDR, E. M. et al. Multiple sclerosis diagnostic delay and its associated factors in Upper Egyptian patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 2249, 8 fev. 2023.

KIJIMA, T. et al. HSP90 inhibitors disrupt a transient HSP90-HSF1 interaction and identify a noncanonical model of HSP90-mediated HSF1 regulation. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 6976, 3 maio 2018.

KIM, S. et al. Myeloid caspase-8 restricts RIPK3-dependent proinflammatory IL-1 $\beta$  production and CD4 T cell activation in autoimmune demyelination. **Proceedings of**

the **National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, n. 24, p. e2117636119, 7 jun. 2022.

KITANO, H. Computational systems biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206–210, nov. 2002.

KLEITER, I. et al. The transitional phase of multiple sclerosis: Characterization and conceptual framework. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 44, p. 102242, set. 2020.

KMIECIK, S. W.; LE BRETON, L.; MAYER, M. P. Feedback regulation of heat shock factor 1 (Hsf1) activity by Hsp70-mediated trimer unzipping and dissociation from DNA. **The EMBO journal**, v. 39, n. 14, p. e104096, 15 jul. 2020.

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 33, n. 11, p. 1444–1444, nov. 1983.

LANZ, T. V. et al. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. **Nature**, v. 603, n. 7900, p. 321–327, 10 mar. 2022.

LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. **FEBS Letters**, v. 585, n. 23, p. 3715–3723, 16 dez. 2011.

LEE, B. et al. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 8, p. 3005–23, ago. 2011.

LUBLIN, F. D. et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 83, n. 3, p. 278–286, 15 jul. 2014.

LUBLIN, F. D.; REINGOLD, S. C. Defining the clinical course of multiple sclerosis. **Neurology**, v. 46, n. 4, p. 907–911, abr. 1996.

LUCCHINETTI, C. F. et al. Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2188–2197, 8 dez. 2011.

LUCHETTI, S. et al. Progressive multiple sclerosis patients show substantial lesion activity that correlates with clinical disease severity and sex: a retrospective autopsy cohort analysis. **Acta Neuropathologica**, v. 135, n. 4, p. 511–528, 13 abr. 2018.

MAITI, G.; NASKAR, D.; SEN, M. The Wingless homolog Wnt5a stimulates phagocytosis but not bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 41, p. 16600–5, 9 out. 2012.

MALPASS, K. “Outside-in” demyelination in MS. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 2, p. 61–61, 17 fev. 2012.

MAMMANA, S. et al. Preclinical evaluation of the PI3K/Akt/mTOR pathway in animal models of multiple sclerosis. **Oncotarget**, v. 9, n. 9, p. 8263–8277, 2 fev. 2018.

MARUNOUCHI, T. et al. Possible involvement of HSP90-HSF1 multichaperone complex in impairment of HSP72 induction in the failing heart following myocardial infarction in rats. **Journal of pharmacological sciences**, v. 123, n. 4, p. 336–46, 2013.

MCDONALD, W. I. et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 50, n. 1, p. 121–127, 26 jul. 2001.

MCFAUL, D. et al. Defining Benign/Burnt-Out MS and Discontinuing Disease-Modifying Therapies. **Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 8, n. 2, 4 mar. 2021.

MELROSE, J.; HAYES, A. J.; BIX, G. The CNS/PNS Extracellular Matrix Provides Instructive Guidance Cues to Neural Cells and Neuroregulatory Proteins in Neural Development and Repair. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, 25 maio 2021.

MIKAMI, T.; LEVY, M. Association of HLA-DRB1\*15:01 Status with Transcriptomic Pattern of B cells in CSF in Multiple Sclerosis (P7-6.011). **Neurology**, v. 102, n. 17, 9 abr. 2024.

MITRA, K. et al. Integrative approaches for finding modular structure in biological networks. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 10, p. 719–732, 18 out. 2013.

MOGHADDAM, V. K. et al. Socioeconomic determinants of global distribution of multiple sclerosis: an ecological investigation based on Global Burden of Disease data. **BMC Neurology**, v. 21, n. 1, p. 145, 1 dez. 2021.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION. **Atlas of MS 2020: Epidemiology**. 3rd ed. [S.I.]: Multiple Sclerosis International Federation, 2020.

MURDOCH, A. D. et al. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 267, n. 12, p. 8544–57, 25 abr. 1992.

MYHR, K. M. et al. Disability and prognosis in multiple sclerosis: demographic and clinical variables important for the ability to walk and awarding of disability pension. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 7, n. 1, p. 59–65, 1 fev. 2001.

NOORI, A. et al. Systematic review and meta-analysis of human transcriptomics reveals neuroinflammation, deficient energy metabolism, and proteostasis failure across neurodegeneration. **Neurobiology of disease**, v. 149, p. 105225, fev. 2021.

PALAMIDESSI, A. et al. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. **Cell**, v. 134, n. 1, p. 135–47, 11 jul. 2008.

PANDITRAO, G. et al. Emerging landscape of molecular interaction networks: Opportunities, challenges and prospects. **Journal of Biosciences**, v. 47, n. 2, p. 24, 20 jun. 2022.

PICARD, D. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 59, n. 10, p. 1640–8, out. 2002.

POLMAN, C. H. et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. **Annals of Neurology**, v. 69, n. 2, p. 292–302, 8 fev. 2011.

QIAN, Z. et al. Global, regional, and national burden of multiple sclerosis from 1990 to 2019: Findings of global burden of disease study 2019. **Frontiers in Public Health**, v. 11, 17 fev. 2023.

RAUDVERE, U. et al. g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W191–W198, 2 jul. 2019.

REYNOLDS, R. et al. The neuropathological basis of clinical progression in multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 122, n. 2, p. 155–170, 28 ago. 2011.

RICARD-BLUM, S. The collagen family. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 1, p. a004978, 1 jan. 2011.

ROBERTS, J.; KAHLE, M. P.; BIX, G. J. Perlecan and the blood-brain barrier: beneficial proteolysis? **Frontiers in pharmacology**, v. 3, p. 155, 2012.

ROBINSON, A. P. et al. Nanocatalytic activity of clean-surfaced, faceted nanocrystalline gold enhances remyelination in animal models of multiple sclerosis. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1936, 11 fev. 2020.

ROJAS, J. I. et al. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis: Multicenter study in Argentina. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 27, n. 4, p. 579–584, 2 abr. 2021.

RUDNITSKAYA, E. A. et al. Alterations of hippocampal neurogenesis during development of Alzheimer's disease-like pathology in OXYS rats. **Experimental gerontology**, v. 115, p. 32–45, jan. 2019.

SATO, A. et al. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. **The EMBO journal**, v. 29, n. 1, p. 41–54, 6 jan. 2010.

SCAFFIDI, C. et al. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 3, p. 1541–8, 15 jan. 1999.

SCALFARI, A. et al. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 85, n. 1, p. 67–75, 1 jan. 2014.

SCHIRMER, L. et al. Neuronal vulnerability and multilineage diversity in multiple sclerosis. **Nature**, v. 573, n. 7772, p. 75–82, set. 2019.

SEIDI, O. A.; SHARIEF, M. K. The expression of apoptosis-regulatory proteins in B lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 130, n. 1–2, p. 202–10, set. 2002.

SELLERS, K. J. et al. Amyloid  $\beta$  synaptotoxicity is Wnt-PCP dependent and blocked by fasudil. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 14, n. 3, p. 306–317, mar. 2018.

SEMRA, Y. K.; SEIDI, O. A.; SHARIEF, M. K. Overexpression of the apoptosis inhibitor FLIP in T cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 113, n. 2, p. 268–74, 15 fev. 2001.

SEN, M. K. et al. Revisiting the Pathoetiology of Multiple Sclerosis: Has the Tail Been Wagging the Mouse? **Frontiers in Immunology**, v. 11, 29 set. 2020.

SHANNON, P. et al. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.

SHARIEF, M. K. Increased cellular expression of the caspase inhibitor FLIP in intrathecal lymphocytes from patients with multiple sclerosis. **Journal of neuroimmunology**, v. 111, n. 1–2, p. 203–9, 1 nov. 2000.

SOLOMON, A. J. et al. The contemporary spectrum of multiple sclerosis misdiagnosis. **Neurology**, v. 87, n. 13, p. 1393–1399, 27 set. 2016.

SOLOMON, A. J. et al. Challenges in multiple sclerosis diagnosis: Misunderstanding and misapplication of the McDonald criteria. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 27, n. 2, p. 250–258, 12 fev. 2021.

SOLOMON, A. J. et al. Global Barriers to the Diagnosis of Multiple Sclerosis. **Neurology**, v. 101, n. 6, p. 250–258, 8 ago. 2023.

STYS, P. K. Pathoetiology of multiple sclerosis: are we barking up the wrong tree? **F1000Prime Reports**, v. 5, 3 jun. 2013.

SZILAGYI, G. T. et al. Proteomic changes during experimental de- and remyelination in the corpus callosum. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0230249, 2020.

TAKEUCHI, M. et al. Type IV Collagen Controls the Axogenesis of Cerebellar Granule Cells by Regulating Basement Membrane Integrity in Zebrafish. **PLoS genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005587, out. 2015.

TEPPER, C. G.; SELDIN, M. F. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. **Blood**, v. 94, n. 5, p. 1727–37, 1 set. 1999.

THOMAS, P. D. The Gene Ontology and the Meaning of Biological Function. **Methods in molecular biology**, v. 1446, p. 15–24, nov. 2016.

THOMPSON, A. J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 2, p. 162–173, fev. 2018.

TITUS, H. E. et al. Pre-clinical and clinical implications of “inside-out” vs. “outside-in” paradigms in multiple Sclerosis etiopathogenesis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 14, p. 599717, 2020.

TORRICELLI, A. A. M. et al. Epithelial basement membrane proteins perlecan and nidogen-2 are up-regulated in stromal cells after epithelial injury in human corneas. **Experimental eye research**, v. 134, p. 33–8, maio 2015.

TREWAVAS, A. A Brief History of Systems Biology. **The Plant Cell**, v. 18, n. 10, p. 2420–2430, out. 2006.

TURCOTTE, L. A. et al. Clinical Profile of Persons with Multiple Sclerosis Across the Continuum of Care. **Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, v. 45, n. 2, p. 188–198, 18 mar. 2018.

VEEMAN, M. T.; AXELROD, J. D.; MOON, R. T. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. **Developmental cell**, v. 5, n. 3, p. 367–77, set. 2003.

WALTON, C. et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 11 dez. 2020.

WHO. **Multiple Sclerosis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/multiple-sclerosis>>. Acesso em: 27 mar. 2024.

WU, J. et al. Influence of oral tobacco versus smoking on multiple sclerosis disease activity and progression. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 94, n. 8, p. 589–596, ago. 2023.

YU, A. et al. Structural analysis of the interaction between Dishevelled2 and clathrin AP-2 adaptor, a critical step in noncanonical Wnt signaling. **Structure** (London, England : 1993), v. 18, n. 10, p. 1311–20, 13 out. 2010.

YUAN, S.; SHI, Y.; TANG, S.-J. Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain. **Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 904–13, dez. 2012.

ZHANG, B. et al. Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. **Cell**, v. 153, n. 3, p. 707–20, 25 abr. 2013.

ZHANG, Y. et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 36, p. 11929–47, 3 set. 2014.

ZIEMSEN, T. et al. A mixed methods approach towards understanding key disease characteristics associated with the progression from RRMS to SPMS: Physicians' and patients' views. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 38, p. 101861, fev. 2020.

ZIEMSEN, T. et al. Secondary Progressive Multiple Sclerosis. **Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, jan. 2023.

ZOU, J. et al. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 471–80, 21 ago. 1998.