



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Instituto Biomédico  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Avaliação do impacto da vitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D3) em  
monócitos de pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente  
Recorrente**

**Rejane Lapagesse Beltrão Silva**

Orientadora : Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vera Carolina Bordallo Bittencourt

Rio de Janeiro

2017

# **Avaliação do impacto da vitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D3) em monócitos de pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente Recorrente**

Trabalho de conclusão de curso, desenvolvido no Laboratório de Imunidade Inata-LIMIN, apresentado junto ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Vera Carolina Bordallo Bittencourt

Rio de Janeiro

2017

## **Avaliação do impacto da vitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D3) em monócitos de pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente Recorrente**

Trabalho de conclusão de curso, desenvolvido no Laboratório de Imunidade Inata-LIMIN, apresentado junto ao Programa de Pós Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, na área de concentração de Imunologia, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

### **Banca Examinadora:**

Dr<sup>a</sup>. Fabrícia Lima Fontes (Doutora em Ciências da Saúde – UFRN)

Dr<sup>a</sup>. Giselle Pinto de Farias Lopes (Doutora em Ciências Morfológicas – UFRJ)

Dr<sup>a</sup>. Landi Veivi Guillermo Costilla (Doutora em Ciências Biológicas – UFRJ)

Dr. Rafael Braga Gonçalves (Doutor em Química Biológica – UFRJ)

LAPAGESSE, Rejane Beltrão Silva

Avaliação do impacto da vitamina D3 (1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D3) em monócitos de pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente Recorrente/ Rejane Lapagesse Beltrão Silva – Rio de Janeiro, 2017.  
p 99.

Trabalho para obtenção do Grau de Mestre – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, 2017.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Vera Carolina Bordallo Bittencourt.

1. Vitamina D 2. Monócito 3. Esclerose Múltipla 4. Título

## Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiam sobretudo e aos pacientes com Esclerose Múltipla, que são as principais motivações por trás deste projeto.*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer em primeiro lugar aos meus pais. Diante de todas as dificuldades que a vida lhes impôs sempre puseram meu bem-estar, minha saúde e educação como prioridades. O amor e apoio incondicional de vocês é, sem dúvidas, meu maior privilégio.

À minha orientadora, Vera, muito obrigada por abrir as portas do laboratório e por aceitar dividir um pouquinho do seu conhecimento comigo. Espero de coração não ter desapontado e ser um dia metade do que você é como professora (porque já vai ser muita coisa!).

À minha amiga-irmã, Bruna, que passou um ano falando no meu ouvido sobre como eu iria amar a imunologia mais do que tudo nessa vida e me convenceu a encarar essa luta que faz parte do meio acadêmico. Uma palavrinha só não descreve minha gratidão por todo carinho, toda a parceria e cumplicidade na vida e na bancada. Nunca serei capaz de agradecer o suficiente, mas sempre estarei aqui para ajudar no que você precisar.

Ao meu amor, Ciro, obrigada pelos 10 anos incríveis, em especial os últimos 2 que contemplam a paciência com esta eterna aluna desesperada. Obrigada pelos carinhos, por todos os cafés e por tudo mais que você me proporciona sempre.

À Laís, Letícia, Luíza e Tamires pela companhia no laboratório, por toda a amizade e por fazerem os dias mais agradáveis. Todo sucesso do mundo nas caminhadas que cada uma resolveu trilhar a partir daqui. Estou muito na torcida por vocês!

Ao professor Rafael, muito obrigada pelo acolhimento nos primeiros meses, pela paciência com a minha digital terrível e por ter me acompanhado e ajudado de perto como meu revisor!

À Aloma, Amanda e Bruna, conhecer vocês foi uma honra e um prazer muito grande. Obrigada por tornarem o sofrimento em bioestatística mais aceitável!

Às minhas amigas Ana, Camilla, Juliana, Juliana, Maria, Marianna, Rafaela, obrigada por singularmente serem tão especiais na minha vida. Vocês juntas constituem um dos meus pilares.

À Adriana, Hanna, Leila, Marion, Raissa e Tatiana, obrigada por ainda estarem tão presentes mesmo após tanto tempo. Vocês foram, certamente, o maior presente que o INCA me deu.

À Dra. Soniza, obrigada por permitir o acesso ao ambulatório de Neurologia e, assim, o desenvolvimento deste trabalho.

Às Dr<sup>as</sup>. Fabíola Rachid e Simone Siquineli, obrigada pelo carinho e convivência durante minhas visitas ao ambulatório e por se tornarem exemplos e inspirações para minha vida profissional.

A todos os professores que passaram por mim nos últimos dois anos e também em todos os outros, sou eternamente grata a tudo que me foi passado com tanta dedicação, mesmo que não de todos, daqueles que o fizeram com vontade e dedicação.

À professora Joelma Freire por lutar por todos os alunos do programa como se fossem seus. Um muito obrigada tão grande que palavras são muito pouco para expressar.

Por fim, mas não menos importante, às minhas filhotas caninas que jamais conseguirão ler, mas que são o motivo de tudo que faço.

## Epígrafe

*“Life is not easy for any of us. But what of that? We must have perseverance and above all confidence in ourselves. We must believe that we are gifted for something and that this thing must be attained.”*

*Marie Curie*



# Sumário

Índice de figuras .....	11
Resumo .....	12
Abreviações.....	14
1. Introdução.....	16
1.1- Esclerose Múltipla .....	16
1.1.1 Aspectos Clínicos .....	16
1.1.2 Epidemiologia.....	21
1.1.3 Tratamentos .....	23
1.2 Imunologia da Esclerose Múltipla.....	28
1.2.1 Imunogenética.....	28
1.2.2 Patogenia.....	30
1.2.4 Monócitos.....	38
1.3 Vitamina D.....	41
1.3.1 Micronutriente e Metabolismo.....	41
1.3.2 Vitamina D e as doenças autoimunes.....	45
1.3.3 – Vitamina D e Mecanismos Epigenéticos .....	46
3.1- Objetivo geral: .....	49
3.2- Objetivos específicos:.....	49
4- Metodologia .....	50
4.1- Amostras.....	50
4.2 – Coleta de sangue e isolamento de monócitos .....	51
4.3 – Ensaios por Citometria de Fluxo .....	52
4.3.1 - Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos <i>ex vivo</i> .....	53
4.3.2 – Avaliação da expressão de moléculas de superfície em monócitos <i>in vitro</i> ...	54
4.4- Análise Estatística .....	55
5. Resultados .....	56

5.1. Comparação da expressão <i>ex vivo</i> de TLR2 e TLR4 entre monócitos de pacientes com EMRR e de indivíduos saudáveis .....	56
5.2. Efeito da vitamina D sobre a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EMRR e de indivíduos saudáveis .....	58
5.3. Comparação da frequência de fenótipos de monócitos entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM-RR. ....	60
5.4. Efeito da vitamina D sobre a expressão de CD116 em monócitos de pacientes com EM-RR.....	62
6- Discussão.....	64
7. Conclusões .....	76
Referências .....	77
ANEXO I.....	94
ANEXO II .....	97

## Índice de figuras

Figura 1	Esquematização do padrão de lesões no SNC de pacientes com EM	16
Figura 2	Escala expandida de status de debilitação (Expanded Disability Status Scale - EDSS)	17
Figura 3	Desregulação do sistema imune fora do SNC	37
Figura 4	Contribuição da Vitamina D na etiologia de doenças.	45
Figura 5	Definição da população celular a ser estudada	55
Figura 6	Nível de expressão dos receptores TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EM-RR e de voluntários saudáveis	58
Figura 7	Comparação da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos ativados ou não com Pam3Cys e LPS entre os grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR.	59
Figura 8	Efeito da vitamina D sobre a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EM-RR e de voluntários saudáveis	61
Figura 9	Efeito de agonistas e da vitamina D na expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR	62
Figura 10	Frequências das subpopulações de CD14 <sup>high</sup> e CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup> em monócitos de pacientes com EMRR e controles saudáveis.	64
Figura 11	Intensidade média de fluorescência de CD116 nas subpopulações de CD14 <sup>+</sup> , CD14 <sup>high</sup> e CD14 <sup>high</sup> CD16 <sup>+</sup> em monócitos de pacientes com EMRR	65

## Resumo

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante que atinge o sistema nervoso central (SNC). Caracteriza-se pela infiltração, no SNC, de linfócitos T CD4+ autorreativos que contribuem para o processo inflamatório atraindo monócitos através da produção da citocina GM-CSF. Junto às células da microglia, os monócitos ao serem ativados via receptores de padrões moleculares, como os TLR, amplificam uma cascata inflamatória que converge nos danos axonais. Doenças autoimunes, como a EM, têm a vitamina D como um possível fator ambiental relevante para sua etiologia e progressão. Sabe-se que a vitamina D é capaz de diminuir a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 em monócitos humanos de forma tempo e dose-dependente tornando a célula menos responsiva aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ao dano celular/tecidual (DAMPs) o que poderia funcionar como um mecanismo de inibição da inflamação excessiva mediada pela ativação dos TLR. Na EM, ainda não são conhecidos os efeitos da vitamina D sobre monócitos. Dessa forma, os objetivos deste estudo incluíram avaliar por Citometria de fluxo, em monócitos de pacientes com EMRR, a influência da vitamina D na modulação da expressão de TLR2, TLR4 e do receptor de GM-CSF (CD116), assim como seu efeito no perfil fenotípico (níveis de CD14 e CD16) destas células. Comparado com monócitos de indivíduos saudáveis, monócitos de pacientes expressam maiores níveis de TLR2 e TLR4 após ativação *in vitro*. A exposição à vitamina D induziu a redução da expressão desses receptores, mesmo na presença dos agonistas, tanto nas células de indivíduos saudáveis quanto nas de pacientes com EM. Não foram observadas evidências do efeito modulador da vitamina D sobre as frequências das subpopulações de monócitos, já a expressão de CD116 entre as células CD14<sup>high</sup> parece ser reduzida pela exposição das células à vitamina D. Concluindo-se que há indícios de que a Vitamina D possa ter como um de seus mecanismos imunoregulatórios a modulação negativa desses receptores.

## Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease of the central nervous system (CNS). It is characterized by infiltration on CNS by autoreactive TCD4+ lymphocytes, which contribute to the inflammatory process attracting monocytes through GM-CSF production. Monocytes, along with microglia cells, when activated by patterns recognition receptors like TLR, amplify an inflammatory cascade, which implies in axonal damage. Autoimmune diseases such as MS have Vitamin D as a relevant environmental factor for its progression and etiology. It is well known that Vitamin D is capable of reducing TLR2, TLR4 and TLR9 expression in human monocytes in a dose-time manner and turning cells less reactive to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs) which could work as an inhibition mechanism of the excessive inflammation through TLR activation. In MS, it has not been established the effects of Vitamin D upon monocytes. The aims of this study included evaluate on monocytes of patients with MS the influence of vitamin D on TLR2, TLR4 and of GM-CSF receptor (CD116) expression, as well as its effect upon phenotypic profile (CD14 and CD16 levels) of these cells by flow cytometry. Compared to monocytes from healthy subjects, monocytes from MS patients express higher levels of TLR2 and TLR4 after in vitro activation. The exposure to Vitamin D reduced the expression of those receptors, even in its agonist's presence in healthy individuals and patients cells. There were not evidences of modulator effect of the vitamin D upon the frequency of monocytes subpopulation; however, CD116 expression between CD14high cells seems to be reduced by the exposure to this vitamin. We concluded that is possible to indicate the negative modulation of those receptors as one of the Vitamin D immunomodulatory mechanisms.

## Abreviações

AJI -	Artrite juvenil idiopática
APC's -	Células apresentadoras de antígeno
BHE -	Barreira Hematoencefálica
DAMP -	Padrão Molecular Associado ao Dano
DIS -	Lesão disseminada no espaço
DIT -	Lesão disseminada no tempo
DM-1 -	Diabete Mellitus Tipo 1
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EDSS -	<i>Expanded Disability Scale</i> (Escala de Desabilidade Expandida)
EAE -	Encefalomielite Aguda Experimental
EM -	Esclerose Múltipla
EMPP -	Esclerose Múltipla Progressiva Primária
EMPS -	Esclerose Múltipla Progressiva com Surto
EMRR -	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP -	Esclerose Múltipla Progressiva Secundária
FCE -	Fluido cérebro-espinhal
FSC -	<i>Foward Scatter</i>
HMGB1-	<i>High Mobillity Group Box 1</i> (Grupo de Alta Mobilidade 1)
HLA -	<i>Human leucocyte antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
LADA -	Diabetes Autoimune Latente do Adulto
LEMP -	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
LES -	Lupus eritomatoso sistêmico
MAG -	Glicoproteína associada com a mielina
MBP -	<i>Myelin Biding Protein</i> (Proteína de Ligação à Mielina)
MFI -	Intensidade Média de Fluorescência
MP -	Metilprednisolona
MOG -	Glicoproteína de oligodendrócitos
NO -	<i>Nitric oxide</i> (Óxido Nitrico)
PAMP -	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i> (Padrão Molecular associado a patógenos)
PBS -	Tampão Fosfato salino
PEG -	PolietilenoGlicol

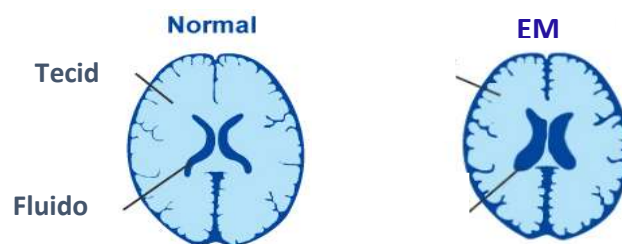
PLP -	Proteína proteolípídica da mielina
RA -	<i>Reumatoid Arthritis</i> (Artrite Reumatóide)
SFB -	Soro fetal bovino
SNC -	Sistema Nervoso Central
SSC -	<i>Side Scatter</i>
TCR -	<i>T Cell Receptor</i> (Receptor de célula T)
TNF -	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)

## 1. Introdução

### 1.1- Esclerose Múltipla

#### 1.1.1 Aspectos Clínicos

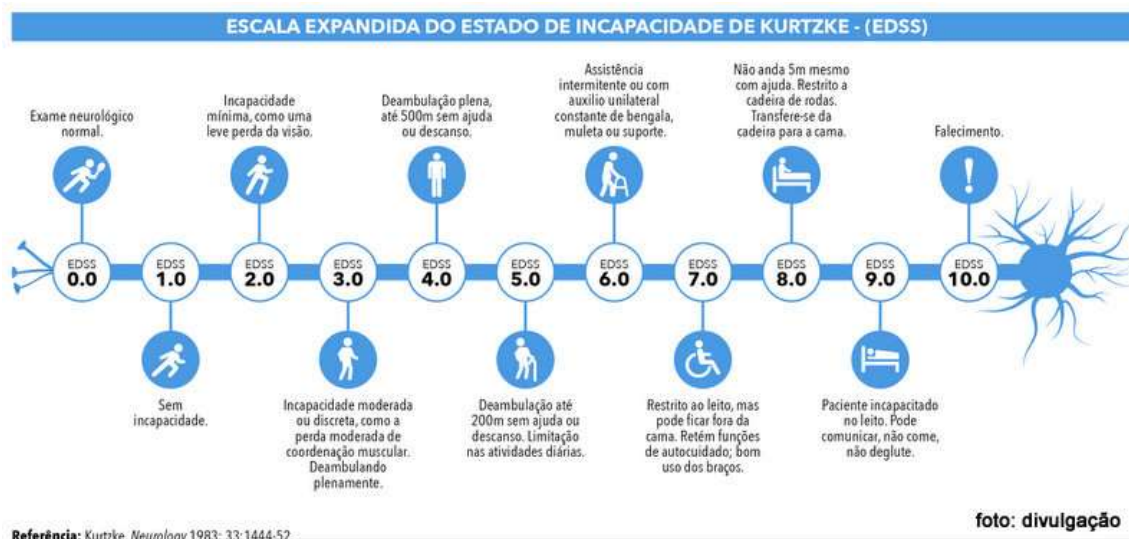
A esclerose múltipla (EM) é uma doença desmielinizante que atinge o sistema nervoso central (SNC) e consiste na maior causa de perda de função não traumática em adultos jovens (WEINSHENKER et al., 1989) , principalmente de 20 a 30 anos (KOCH-HENRIKSEN; SØRENSEN, 2010). Sua característica mais relevante é a formação de lesões focais e difusas na substância branca (LASSMANN; BRÜCK; LUCCHINETTI, 2007) cujas presenças se relacionam ao aparecimento de sintomas que podem comprometer funções piramidais (paraparesia, hemiparesia, monoparesia, quadriplegia), cerebelares (ataxia e dificuldades motoras relacionadas), tronco cerebrais (nistagmo, disartria, dificuldade na fala ou deglutição), sensoriais (estereognosia e reduções na sensibilidade tátil ou a dor), intestinais (incontinência ou obstipação), vesicais (incontinência), visuais (escotoma e redução do campo visual), cerebrais e psiquiátricas (alterações de humor, mentação, demência ou grave síndrome cerebral crônica) (KURTZKE; KURTZKE, 1983).



**Figura 1: Esquematização do padrão de lesões no SNC de pacientes com EM.** (Disponível em [https://my-ms.org/symptoms\\_atrophy.htm](https://my-ms.org/symptoms_atrophy.htm))



Com base no comprometimento desses sistemas, em 1955, Kurtzke desenvolveu uma escala para classificação de pacientes com esclerose múltipla a fim de dividi-los em possíveis grupos com potencial tratamento pela laniazida que ficou conhecido como *Disability Status Scale (DSS)*, que considerava avaliações neurológicas e os níveis de comprometimento apresentados por cada indivíduo. Esses parâmetros foram, então, expandidos e em 1983, Kurtzke apresentou a *Expanded Disability Status Scale (EDSS)* que varia de 0 a 10, onde o primeiro apresenta exames neurológicos normais e o último representa óbito por EM, como representado na Figura 2. Essa escala é atualmente utilizada para avaliação da incapacidade da doença nos indivíduos acometidos no Brasil e no mundo.



**Figura 2: Escala expandida de status de debilitação (Expanded Disability Status Scale - EDSS)** (Disponível em <http://paranashop.com.br/2017/02/esclerose-multipla-atinge-cerca-de-30-mil-brasileiros-mas-ainda-e-subdiagnosticada/> )

O curso clínico da EM pode ser considerado a expressão de dois fenômenos clínicos: surtos de sintomas neurológicos agudos, que se caracterizam pelo agravamento de déficits anteriores ou de novos sintomas neurológicos, que

terminam com remissão parcial ou completa, e progressão, que se refere à piora irreversível dos sinais e sintomas por um período igual ou superior a 6 meses (MACHADO, 2012).

O curso e a sintomatologia da EM são heterogêneos, apesar disso, os esforços de categorizar pacientes por padrões gerais da apresentação da doença permitiram a categorização da doença em diversos subtipos. A forma mais comum, que afeta aproximadamente 85% dos pacientes, é a remitente recorrente. Sua caracterização se dá a partir de um único episódio de disfunção neurológica (síndrome clinicamente isolada), seguida de um período de remissão com recuperação clínica e então alternando entre surtos e remissões. Esses surtos são tipicamente reconhecíveis a partir da utilização da Ressonância magnética e observações das lesões presentes na substância branca. Normalmente, a recuperação nos períodos de remissão é reduzida conforme ocorre o acúmulo de incapacidades acumuladas. Assim, aproximadamente 80% desses pacientes evolui para a forma secundariamente progressiva. Dessa forma, lesões inflamatórias não são mais características e o declínio neurológico progressivo é acompanhado de atrofia, que consiste na redução do volume cerebral e aumento da perda axonal (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

De acordo com informações presentes na [NationalMSSociety.org](http://NationalMSSociety.org) e baseado nos critérios diagnósticos de McDonald (2001) (revisado em 2005 e 2010 por POLMAN), a EM pode ser classificada como primária progressiva (EMPP) quando ocorre piora na função neurológica de forma contínua desde o surgimento dos

sintomas, sem surtos e remissões; surto-progressiva (EMPS), podendo representar um subtipo da EMPP por compartilharem uma história natural similar, quando a doença se apresenta desde o início na forma progressiva, com a presença de surtos agudos com ou sem recuperação total e os períodos entre os surtos são caracterizados por contínua progressão; forma remitente-recorrente (EMRR), onde após um período de agravamento dos sintomas, denominado surto, há uma recuperação total ou parcial (remissão) e pode ainda ser classificada como forma secundária progressiva (EMSP), na qual, após um período de tempo possuindo recuperação dos sintomas (remitente-recorrente), o paciente passa a não se recuperar mais e há avanço crescente no agravamento das manifestações clínicas da doença.

O diagnóstico é realizado por meio da análise das manifestações clínicas, exames por imagem, como a ressonância magnética, exames laboratoriais e diante de avaliação neurológica realizada por médicos neurologistas. Assim, o estudo deste conjunto de achados e o monitoramento do paciente são essenciais para a confirmação do quadro de esclerose múltipla (FISCHER et al., 1999), sendo o conjunto dos critérios de McDonald, apresentados no Quadro 1, o mais utilizado mundialmente.

Critérios de McDonald de 2010 para o diagnóstico da esclerose múltipla	
Apresentação da Clínica	Dados adicionais necessários para diagnosticar a EM
≥ 2 surtos: evidências clínicas objetivas de ≥ 2 lesões ou evidências clínicas de 1 lesão, com história de surto progressivo	- <b>Nenhum</b>
≥ 2 surtos; evidências clínicas objetivas de 1 lesão	- <b>Sinais de DIS:</b> ≥ 1 lesão em T2 em ao menos 2 dentre os 4 sítios: periventricular, justacortical, infratentorial e medula espinhal.
1 surto, com sinais clínicos evidentes de ≥ 2 lesões	- <b>Sinais de DIT:</b> Caracterizado de 1 nova lesão em T2 em exame subsequente, independentemente do tempo decorrido desde o primeiro exame, ou caracterização simultânea de lesões assintomáticas com impregnação pelo gadolínio e lesões sem impregnação ou aguardar novo surto clínico
1 surto, com sinais clínicos evidentes de 1 lesão (síndrome clínica isolada, ou CIS)	<p align="center"><b>Sinais de DIS e DIT</b></p> <p>- Para DIS: ≥ 1 lesão em T2 ou aguardar novo surto acometendo sítio diferente no SNC</p> <p>- Para DIT: caracterização de 1 nova lesão em T2 em exame subsequente, independentemente do tempo decorrido do primeiro exame, ou caracterização simultânea de lesões assintomáticas com impregnação pelo gadolínio e lesões sem impregnação ou aguardar novo surto clínico</p>

**Quadro 1: Resumo dos critérios de McDonald revisados em 2010.** DIS: lesão disseminação no espaço. DIT: lesão disseminada no tempo (Adaptado de POLMAN et al., 2011).

### 1.1.2 Epidemiologia

Com os avanços médicos e biotecnológicos desenvolvidos nas últimas décadas foi possível ampliar os conhecimentos sobre a EM e caracterizá-la com maior precisão, otimizando-se assim, seu diagnóstico.

De acordo com o último levantamento realizado, estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas no mundo vivam com EM (ROSATI, 2001) e que aproximadamente 10.000 pacientes estejam em tratamento no Brasil, segundo consulta ao DATASUS.

Estudos geográficos realizados por Kutzke (1968) permitiram a divisão das prevalências de EM no mundo em três zonas: alta prevalência, média prevalência e baixa prevalência. Dessa forma, foram consideradas zonas de alta prevalência, aquelas com índices de 30/100.000 habitantes, sendo essas o norte da Europa e dos Estados Unidos, sul do Canadá, Austrália e Nova Zelândia. O sul da Europa, dos Estados Unidos e a maior parte da Austrália são considerados de média prevalência, com taxas de 5 a 25/100.000 habitantes enquanto que Ásia e África são consideradas zonas de baixa prevalência com taxas inferiores a 5/100.000 habitantes. Esses estudos iniciaram as especulações sobre um gradiente relacionado à latitude para a distribuição da EM, de forma que o aumento da latitude esteja diretamente relacionado a maior chance de desenvolvimento desta doença (KURTZKE et al., 1968).

A América do Sul é considerada região de baixa prevalência, no entanto, algumas regiões do Brasil podem ser consideradas de média

prevalência, destoando deste cenário. “*Segundo o relatório da Federação Internacional de Esclerose Múltipla para a Organização Mundial de Saúde, realizado em 2008, ocorre menor prevalência em países próximos à linha do Equador e a maior prevalência em áreas localizadas entre 44 e 64 N de latitude. No Brasil, observa-se maior incidência da doença no Sul e Sudeste; na região Nordeste (área mais próxima da linha do Equador) a prevalência é de 10 casos por 100.000 habitantes. Na região Sudeste (dados de São Paulo, Santos, Belo Horizonte, Uberaba, Botucatu e Sorocaba) essa prevalência aumenta para 12 a 18 por 100.000 habitantes; na região centro-oeste varia desde 4,41 para 100.000 habitantes até 19 para 100.000 habitantes e na região Sul a prevalência é a maior do país, variando entre 14 a 27, para 100.000 habitantes*” (GRZESIUK, 2006). Estudos locais mais recentes apontam aumento da prevalência entre 2008 e 2012 e mostram que a mesma varia de 12,5 a 27/100.000 habitantes e também corroboram os dados da literatura, indicando que há maior prevalência entre mulheres, variando de 71.4% a 76.8%, sendo 2,23 vezes maior do que nos homens, e entre caucasianos, 77% a 85.7%, em idades entre 35 e 37 anos para os dois grupos. Além disso, foi observado que Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Distrito Federal apresentaram prevalência maior do que a nacional, aproximadamente 0,9 mais elevada, enquanto que os menores índices foram vistos em Alagoas e Paraíba (SILVA et al., 2015). No estado do Rio de Janeiro a prevalência da EM observada foi de 1,88/100.000 habitantes,

tendo como base o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística de 2010 (ALBERTO et al., 2013).

A observação desses dados ratifica a relação entre latitude e a alta prevalência da doença. Na tentativa de estabelecer uma justificativa para esse fenômeno, muitos estudos foram realizados e o fator proeminente encontrado foi a variação da incidência de radiação solar ultravioleta, que está diretamente atrelada a variações nos níveis plasmáticos de vitamina D (SIMPSON et al., 2011).

### 1.1.3 Tratamentos

Após o diagnóstico, de acordo com o estadiamento do paciente e de suas principais queixas, é realizada a escolha do procedimento terapêutico a ser empregado. No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza uma diretriz de tratamentos estabelecida pela portaria nº 1.505, de 29 de dezembro de 2014 de caráter nacional, que deve ser utilizada pelas Secretarias de Saúde dos Estados e dos Municípios na regulação do atendimento assistencial (PIMENTA, 2015).

Uma das primeiras linhas a serem empregadas é a dos imunossupressores a base de interferons, que podem ser o interferon  $\beta$ -1a (Rebif® e Avonex®) ou interferon  $\beta$ -1b (Betaferon®), que são citocinas anti-inflamatórias produzidas a partir da técnica de DNA recombinante com ação anti-proliferativa, reduzindo o crescimento celular (STARK et al., 1998). Esses medicamentos demonstraram, em estudos clínicos, desacelerar a progressão da incapacidade, reduzir a taxa de

surtos e o número de lesões ativas medidas por ressonância magnética (GROUP, 1993); (COHEN; RIVERA, 2010).

Outro fármaco aprovado para tratamento, o acetato de glatirâmer (Copaxone®) é uma mistura de polipeptídios sintéticos contendo quatro aminoácidos (L-alanina, L-ácido glutâmico, L-lisina e L-tirosina) que apresenta reação cruzada com a proteína básica da mielina, tendo sido demonstrado experimentalmente a redução ou inibição da EAE (encefalite experimental autoimune) (ARNON; AHARONI, 2004). Além disso, o tratamento com acetato de glatirâmer (GA) é capaz de induzir uma mudança do perfil Th1 para Th2 em células T- GA reativas que parecem agir como células regulatórias gerando efeitos benéficos em doenças autoimunes (NEUHAUS et al., 2001).

Nos últimos anos, o aumento das pesquisas acerca da patogenia dessa doença permitiu o desenvolvimento de novos fármacos, que já são empregados na rotina, como o Natalizumab (Tysabri®) e Fingolimóide (Gylenia®). O primeiro, compreende um anticorpo monoclonal específico para  $\alpha 4$  integrina, molécula presente na superfície de alguns leucócitos, principalmente em linfócitos, que se relaciona com a migração dessas células através da barreira hematoencefálica (BHE) permitindo que atinjam o SNC, danificando o tecido. Dessa forma, o bloqueio da  $\alpha 4\beta 1$ -integrina contribui para a redução do extravasamento destas células e culmina na redução do processo inflamatório desencadeado por elas (LOREFICE et al., 2014). Já o Fingolimóide compreende um modulador da expressão do receptor para enfiingosina-1-fosfato (FTY720) (BRINKMANN, 2002) que atua



umentando a permanência dos linfócitos T nos tecidos linfoides secundários, uma vez que este mediador lipídico é necessário para o egresso destas células (MATLOUBIAN et al., 2004).

Esses dois novos medicamentos possuem eficácia comprovada em pacientes com Esclerose Múltipla na sua forma Remitente-Recorrente reduzindo os surtos, a progressão da doença e o surgimento de novas lesões observáveis pela ressonância magnética (DEVONSHIRE et al., 2012)(POLMAN et al., 2006), no entanto sérios efeitos adversos foram associados a suas administrações. O uso de Natalizumab foi associado ao aparecimento de leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), principalmente com uso prévio ou concomitante de imunossupressores (CLIFFORD et al., 2010) enquanto o Fingolimóide, por sua vez, pode acarretar danos ao sistema cardiovascular como bradicardia, bloqueio da condução atrioventricular no momento da primeira utilização, edema macular, aumento dos níveis das enzimas hepáticas e hipertensão discreta (KAPPOS et al., 2010), motivos pelos quais a primeira infusão deve proceder em ambiente hospitalar e após avaliação cardiológica.

Outra substância recentemente liberada para o tratamento dessa doença é o dimetil fumarato (Tecfidera®), éster derivado do ácido fumárico, que exerce efeito citoprotetor por via relacionada a respostas ao estresse oxidativo (VENCÍ; GANDHI, 2013). Foi recentemente demonstrado que seu mecanismo de ação envolve a inibição da produção de citocinas via TLRs, embora seja considerado que dificilmente seu efeito esteja atrelado apenas a um mecanismo e sugerido que esse

fármaco possa atuar alterando uma série de proteínas celulares através da modificação de cisteínas reativas presentes em seus alvos (MCGUIRE et al., 2016).

Em 2014, a Anvisa liberou mais dois medicamentos para a utilização em pacientes com EM, a Teriflunomida (AUBAGIO®) e o Alemtzumab (LEMTRADA®). A Teriflunomida constitui um fármaco de via de administração oral com boa aceitabilidade clínica. Seu mecanismo de ação sugerido compreende a inibição de uma enzima mitocondrial encontrada em altas concentrações em células com grande capacidade proliferativa e participa do processo de divisão celular. Dessa forma, sua inibição acarreta a interrupção do ciclo celular na fase S, exercendo efeito citostático em linfócitos T e B, diminuindo, conseqüentemente, o número dessas células no SNC. Outras populações celulares não são obrigatoriamente afetadas possuindo vias alternativas de sobrevivência (GOLD; WOLINSKY, 2011). Clinicamente, apesar de poder acarretar uma redução no número de linfócitos circulantes, não há associação com a redução da competência imunológica (BAR-OR et al., 2014).

O Alemtuzumab é um anticorpo monoclonal anti-CD52 cuja administração é feita em dois ciclos anuais via intravenosa. Esse fármaco causa citotoxicidade dependente de anticorpo e lise celular mediada pelo sistema complemento. Dessa forma, ocorre decréscimo quantitativo dos linfócitos T e B sem que haja muito impacto nas células do sistema imune inato (BAR-OR et al., 2014). Além disso, a reposição dos linfócitos T parece ocorrer de forma mais tardia. Dessa forma, acredita-se que alteração no balanço destas células possa contribuir para os efeitos

anti-inflamatórios e assim diminuir a propensão aos surtos e desacelerar a progressão da doença (HARTUNG; AKTAS; BOYKO, 2015).

Em 2016, o Beta-peginterferon-1a (PLEGRIDY®) foi liberado, medicamento que consiste no interferon beta-1a conjugado a uma molécula de metoxi-polietileno-glicol (PEG). Estudos clínicos realizados com administração feita quinzenalmente via injeções subcutâneas demonstram haver redução na taxa de surtos e interrupção da progressão de desabilidade capazes de serem verificados mesmo após um ano da realização do tratamento. Esses resultados associados à menor frequência de administração e mesma segurança tornam esse medicamento vantajoso em comparação com outros fármacos a base de interferon que requerem aplicações mais frequentes (CALABRESI et al., 2014; KIESEIER et al., 2015; LYSENG-WILLIAMSON; HOY, 2015).

Além desses medicamentos, muitos outros vêm sendo estudados, mas em razão dos fortes efeitos colaterais ainda não são empregados. Outro fator a ser levado em consideração é a possibilidade de determinadas terapias serem úteis em um grupo de pacientes ou em uma fase, mas deletérias em outros, o que se deve a identificação de diferenças nos mecanismos de desmielinização em subgrupos distintos da doença (LUCCHINETTI et al., 2000), ressaltando a importância da identificação e caracterização dos mecanismos patológicos da EM.

Na ocorrência dos surtos há outras alternativas de tratamento visando à sua resolução. O manejo desse quadro é normalmente realizado através da

administração de corticosteroides, uma vez que foi concluído em uma metanálise a capacidade destes fármacos de reduzir a duração dos sintomas durante esses episódios. Os corticoides têm ampla ação anti-inflamatória, inibindo a síntese de citocinas, mediadores inflamatórios e moléculas de adesão, o que regula a permeabilidade da BHE e reduz a migração de células inflamatórias para dentro do SNC. Além disso, induzem a apoptose dos linfócitos T através da ativação do receptor de glicocorticoide (ONTANEDA; RAE-GRANT, 2009). O tratamento recomendado para os surtos é com doses de 500 a 1000 mg ao dia de metilprednisolona (MP) por 3 a 5 dias, seguido ou não de corticoide oral em doses decrescentes por 21 dias, sendo desconhecida a eficácia da administração desse medicamento via oral após tratamento endovenoso (MACHADO, 2012).

## 1.2 Imunologia da Esclerose Múltipla

### 1.2.1 Imunogenética

Com o crescimento da Biologia Molecular, Genética e Imunologia, nos últimos anos foi possível a identificação de variantes genéticas que possam estar atreladas ao desenvolvimento de doenças como a esclerose múltipla. Essa noção surge a partir de estudos epidemiológicos que observam a presença de agregados familiares com a presença da doença (ROBERTSON et al., 1996) e da análise de pacientes e suas famílias acerca de cálculos do risco de recorrência que, em estudos prévios foram capazes de estimar um risco de 18,2% em gêmeos monozigóticos, 2,7% entre irmãos com os mesmos pais e um aumento significativo

desse risco em gêmeos dizigóticos em relação à não gêmeos (O’GORMAN et al., 2013). Esse mesmo trabalho propôs uma estimativa de risco relativo entre 18-24% de contribuição dos 57 loci associados ao desenvolvimento de EM, corroborando com a noção de que o surgimento da doença esteja associado tanto a fatores genéticos quanto a ambientais.

Nesse contexto, há décadas se relaciona o desenvolvimento de EM a variações nos genes HLA (do inglês *human leucocyte antigens*) (NAITO et al., 1972) e se relaciona a dificuldade de determinar com maior precisão os haplótipos relacionados à maior razão de chances à intensa presença de polimorfismos e ao desequilíbrio de linkage observado na herança desses genes (HORTON et al., 2008). Atualmente, há ao menos um alelo (HLA-DRB1\*15:01) descrito como um dos principais fatores genéticos relacionados ao maior risco de desenvolvimento de EM e ao menos um alelo (HLA-A\*02:01) foi relacionado a um efeito protetor, sendo possível que outras variantes não codificadas nessas regiões também possam estar atreladas ao risco de desenvolvimento dessa patologia (PATSOPOULOS et al., 2013).

Embora alguns fatores da genética clássica se relacionem com a manifestação da doença, ainda não são determinantes para o aparecimento dessa condição. Assim, se a informação contida no DNA fosse determinante, o índice de concordância para o desenvolvimento de EM em gêmeos monozigóticos seria o mesmo. No entanto, há um baixo índice de concordância para esse fator (entre 18% e 26%)(EBERS et al., 1986). Nesse cenário, a epigenética talvez possa explicar

porque uma parcela de indivíduos geneticamente suscetíveis possa vir a permanecer saudável enquanto outra adocece (POSER, 2004). Esse ramo consiste no estudo de heranças de alterações mitóticas e/ou meióticas que ocorrem sem alterações na sequência da DNA. Dessa forma, os mecanismos envolvidos nesses tipos de alteração se relacionam com a modulação do estado de enovelamento do material genético, permitindo o controle da expressão gênica por meio do controle da acessibilidade da maquinaria transcricional às regiões dos genes (BERGER et al., 2009).

Na EM já se observou a possibilidade de alterações no padrão de acetilação das histonas em regiões aparentemente normais da substância branca, acarretando aumento da imunorreatividade (PEDRE et al., 2011) e aumento de inibidores transcricionais da maturação de oligodendrócitos (LI et al., 2009).

Outra alteração já averiguada em pacientes com EM é a expressão diferenciada de certos miRNAs que exercem efeito sobre a modulação da via de NF- $\kappa$ B, que desempenha um papel central da regulação da resposta imune (KELLER et al., 2009; LI et al., 2010). Além disso, o aumento de determinados miRNAs já foram atrelados ao escape de macrófagos ao controle inibitório, contribuindo para a fagocitose da mielina e assim contribuindo para a manifestação da doença (JUNKER et al., 2009).

### 1.2.2 Patogenia

A compreensão dos diversos papéis do sistema imunológico nos eventos que desencadeiam o desenvolvimento da EM, assim como aqueles que contribuem para a progressão da doença é difícil devido à fisiopatologia multicelular associada à infiltração de células da imunidade inata e adaptativa no SNC assim como das células residentes nesse tecido (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Acerca do local de predileção para o estabelecimento das lesões que caracterizam a EM, foi observado que o córtex cerebral constitui a região mais afetada pela desmielinização (HAIDER et al., 2016). A presença de danos à substância cinzenta tem sido associada à piora a longo prazo das funções físicas e cognitivas (CALABRESE et al., 2009) e, além disso, estudos têm demonstrado que a atrofia da substância cinzenta reflete melhor a progressão da desabilidade do que a atrofia da substância branca (CALABRESE et al., 2013), demonstrando como os mecanismos patológicos de degeneração dessa região desempenham importante papel. Somado a isso, a presença de sinais característicos da ativação da imunidade inata e adaptativa pode ser encontrada em autópsia de lesões corticais (FISCHER et al., 2013).

A inflamação observada na EM consiste em reações imunes mediadas por células T que levam ao recrutamento de leucócitos como monócitos, células dendríticas e posterior ativação das células da microglia (STEINMAN, 1996). Através da análise de lesões ativas no SNC e da produção de citocinas em pacientes foi estabelecida uma relação entre a manifestação da doença e a forte presença de linfócitos TCD4<sup>+</sup>. Além disso, já foi observado em modelo murino que

monócitos CCR2<sup>+</sup> desempenham papel central da desmielinização cortical (LAGUMERSINDEZ-DENIS et al., 2017).

Apesar de observações clínicas contribuírem para a expansão do conhecimento acerca dos mecanismos da doença, os maiores avanços sobre a compreensão dos processos de imunopatogenia foram obtidos a partir de modelos experimentais em roedores. Dessa forma, a partir da injeção de antígenos da bainha de mielina associados a adjuvantes é possível causar encefalomielite na forma aguda, crônica, com surtos e remissões, denominada EAE, modelo murino utilizado para estudo da EM (ZAMVIL; STEINMAN, 1990). A partir desse modelo, foi possível isolar células T encefalitogênicas específicas à proteína básica de mielina (MBP – *myelin basic protein*) (BEN-NUN; WEKERLE; COHEN, 1981). Dessa forma, uma hipótese que explicaria a EM é a existência de células T no sistema imune periférico, sobreviventes do controle tímico de seleção negativa por depleção clonal, potencialmente autorreativas, com receptores de antígenos específicos (TCR) para componentes proteicos da mielina (RICHERT et al., 1983).

Componentes proteicos associados à mielina são responsáveis pelo desencadeamento da resposta imune observada na EM, sendo eles: a proteína básica da mielina (MBP) (OTA et al., 1990), proteína proteolípídica da mielina (PLP)(ANDERSON et al., 2000), glicoproteína de mielina de oligodendrócitos (MOG)(BERNARD et al., 1997), glicoproteína associada com a mielina (MAG), fosfodiesterase dos nucleotídeos cíclicos; a proteína básica oligodendrocítica associada à mielina; a glicoproteína específica oligodendrocitária e a proteína



Nogo-A. Muitas dessas proteínas são apresentadas no timo durante a seleção negativa, corroborando a hipótese da falha nesse mecanismo estar associada a etiologia da doença (BRUNO et al., 2002; MORRIS-DOWNES et al., 2002). Além disso, algumas proteínas exógenas podem se relacionar com a patogenia da EM devido a semelhanças estruturais. Dessa forma, já foi observado que há proteínas virais e bacterianas que mimetizam autoantígenos e são capazes de ativar células T (WUCHERPFENNIG; STROMINGER, 1995).

Esses antígenos encefalitogênicos podem estar presentes na corrente sanguínea, serem endocitados por células apresentadoras de antígenos (APCs), que ao entrarem em contato com linfócitos T com TCR específico para esses antígenos irão responder sendo ativados (TROTTER et al., 1991, 1998; WING et al., 2003; ZHANG et al., 1994). A presença desses linfócitos autorreativos já foi observada em indivíduos saudáveis, no entanto, parecem estar presentes em menores concentrações do que em pacientes (BURNS et al., 1983). Um aspecto que favorece esse fenômeno é a presença de um ambiente pró-inflamatório, que permite a maturação das células responsáveis pela apresentação desses antígenos. Dessa forma, já foi observado que pacientes com EM parecem possuir maiores níveis de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e a patógenos (PAMPs), que alimentam positivamente esse estado inflamatório a partir da interação com os receptores do tipo Toll (MARTA, 2009).

Em decorrência do processo inflamatório periférico, a permeabilidade da BHE se torna aumentada e assim os linfócitos ativados, que expressam maiores

níveis de integrinas e moléculas de adesão, conseguem aderir com maior firmeza ao endotélio e realizar a diapedese para o espaço perivascular alcançando o SNC (FRISCHER et al., 2009). Diversas quimiocinas atuam favorecendo este processo mediando a migração de linfócitos T, monócitos e células dendríticas para dentro do SNC (PANEK; BENVENISTE, 1995) .

Em estudos com EAE, observa-se que algumas células T vão para o SNC e se alojam em leptomeninges antes do início da doença, posteriormente, se deslocam pelo endotélio através das integrinas  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) e  $\alpha L$  e então extravasam para o parênquima cerebral. Essas células T extravasadas continuam a se deslocar na superfície externa do parênquima cerebral até o encontro com APCs que apresentam antígenos endógenos (KAWAKAMI et al., 2005). A partir dessa interação, essas células T reconhecem esses autoantígenos e são ativadas, aumentando a produção de citocinas inflamatórias responsáveis pela ativação das células da microglia e pela ampliação da permeabilidade da BHE, contribuindo para a penetração de fagócitos, como os monócitos, no SNC (KAWAKAMI et al., 2012; OKADA; KHOURY, 2012)

Estudos apontam que as células Th17 autorreativas constituem a primeira população de células a se infiltrar no SNC (REBOLDI et al., 2009). Nesse contexto, os linfócitos Th17 parecem ser essenciais na patogenia de numerosas doenças inflamatórias tendo sido demonstrado que há expressão dos receptores para IL-17 e IL-22 em células endoteliais da BHE em lesões de esclerose múltipla e que a presença dessas interleucinas é capaz de perturbar as junções oclusivas

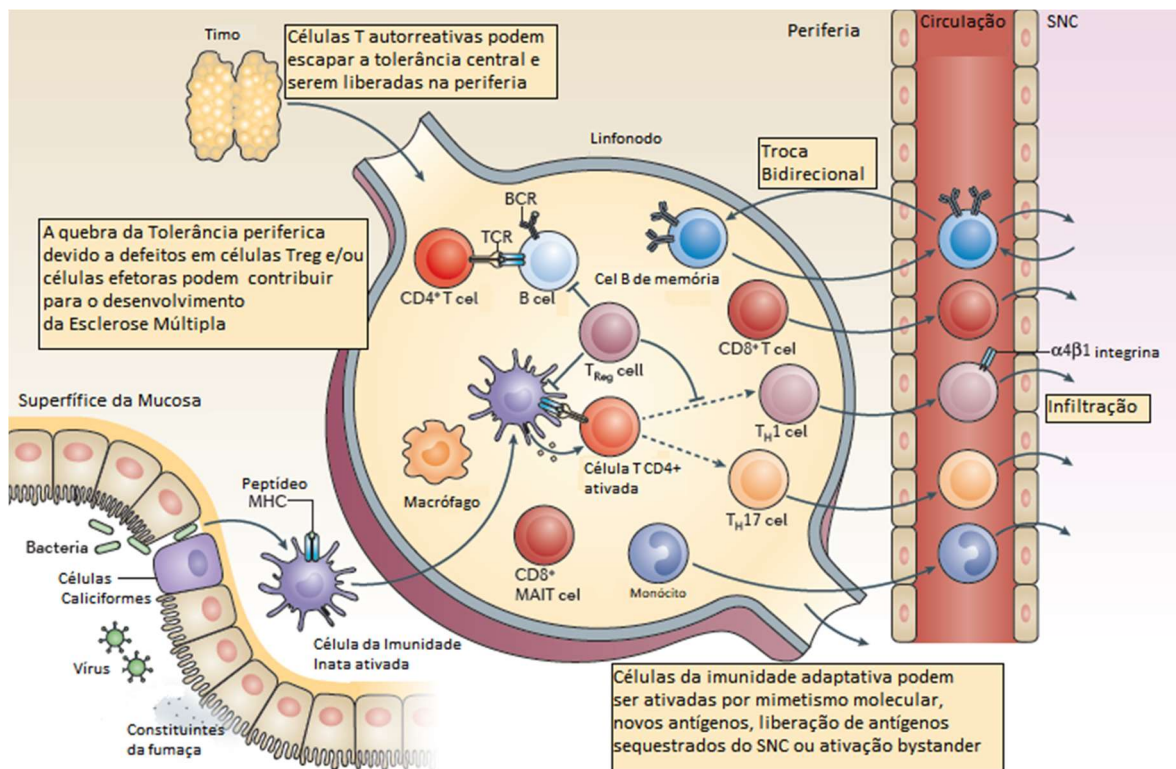
da BHE. Além disso, os linfócitos Th17 transmigram de forma eficiente por toda BHE, possuem uma forte expressão de granzima B, o que indica uma ação citolítica sobre as células do SNC, sendo, portanto, responsáveis pelo desencadeamento da inflamação no SNC e pela morte de inúmeros neurônios (KEBIR et al., 2007). Foi demonstrado que células Th17 e células T CD4+ que produzem IFN- $\gamma$  e IL-17, denominadas células Th1/Th17, se infiltram no SNC antes do desenvolvimento dos sintomas clínicos da EAE, o que coincide com a ativação da microglia e com a produção local de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6. Essa subpopulação Th1/Th17 progressivamente perde sua capacidade produtora de IL-17 e, em humanos, evidências sustentam a hipótese de que estas células podem ser mais agressivas do que linfócitos T polarizados, podendo favorecer a progressão de doenças (MURPHY et al., 2010)

Trabalhos mais recentes atrelaram o caráter encefalitogênico das células Th1 / Th17 à sua produção da citocina GM-CSF (CODARRI et al., 2011; CRAVENS et al., 2011; EL-BEHI et al., 2011), citocina que além de induzir sobrevivência, proliferação e diferenciação de precursores hematopoiéticos, promove a sobrevivência e a ativação de macrófagos, neutrófilos e a maturação de células dendríticas. A expressão de GM-CSF por células Th17 é suprimida por TGF- $\beta$  e estimulada por IL-23. Desta forma tem-se uma alça de amplificação da resposta já que a IL-23 produzida por APCs induz a produção de GM-CSF por células Th17, e estas por sua vez, estimulam a produção de IL-23 pelas APCs. Além da IL-23, a IL-1 $\beta$ , também derivada de APCs, aumenta

significativamente a expressão de GM-CSF pelos linfócitos T tornando-os altamente patogênicos (EL-BEHI et al., 2011). Tem sido demonstrado o papel fundamental do GM-CSF na diátese de diversas doenças inflamatórias humanas tais como a artrite reumatoide, doença inflamatória renal e distúrbios pulmonares inflamatórios, como a asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (HAMILTON; ANDERSON, 2004). Na EM, essa citocina é encontrada em abundância no SNC e em estudos in vitro foi relatado o seu efeito estimulatório sobre a capacidade migratória de monócitos através da BHE (VOGEL et al., 2015).

Além das células T, os linfócitos B também vêm sendo atribuídos ao surgimento da EM. Células B foliculares foram associadas ao desenvolvimento de patologia cortical mais severa e menor idade de manifestação da doença (MAGLIOZZI et al., 2007). Assim como as células T, os linfócitos B também são atraídos para o SNC (CEPOK et al., 2005) onde produzem imunoglobulinas capazes do reconhecimento da mielina, contribuindo, assim, para o dano nesta porção lipídica..

Apesar do conhecimento sobre mecanismos que envolvem o desenvolvimento da EM, o estímulo inicial que influencia na apresentação de autoantígenos da mielina aos linfócitos ainda é desconhecido. Alguns dos aspectos celulares envolvidos na patogênese da EM podem ser observados na Figura 3.



**Figura 3: Desregulação do sistema imune fora do SNC.** Durante o estabelecimento da tolerância central no timo a maioria das células T autorreativas é depletada, no entanto esse processo é imperfeito e algumas células t autorreativas são liberadas para a periferia. Em indivíduos saudáveis, os mecanismos de tolerância periférica mantêm essas células controladas. Se esses mecanismos falham – com influência da função regulatória das células T regulatórias (Treg) e/ou do aumento da resistência de células B efetoras e células T a mecanismos supressores – células T e B autorreativas contra autoantígenos do SNC podem ser ativadas na periferia e se tornarem efetoras agressivas por mimetismo molecular, apresentação de antígenos próprios, reconhecimento e sequestro de antígenos no SNC liberados da periferia. Fatores genéticos e ambientais, incluindo agentes infecciosos e constituintes do cigarro podem contribuir para esses eventos. Uma vez ativadas, as células T CD8+, Th1, Th17, linfócitos B e células da imunidade Inata, como o monócito, podem infiltrar o SNC, levando a inflamação e ao dano tecidual. Células B circulantes fora do SNC podem passar por maturação de afinidade nos linfonodos antes de reingressar no órgão alvo e promover danos. Setas pontilhadas indicam diferenciação. BCR – receptor de célula B; CD8+ MAIT – CD8+ associada a mucosa invariante; TCR – receptor de célula T (DENDROU; FUGGER; FRIESE, 2015).

Entre os componentes do sistema imune inato, os macrófagos, monócitos e os receptores do tipo Toll têm recebido maior atenção e sido reconhecidos dentro da patogenia da EM (MÜNZ; STEINMAN; FUJII, 2005; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003).

Estudos sugerem que haja uma correlação entre os níveis de TNF- $\alpha$  presentes no sangue e no fluido cérebro-espinhal (FCE) (BECK et al., 1988) e até mesmo que seja possível prever surtos a partir do monitoramento das concentrações desta citocina, que estariam elevadas nessas circunstâncias (CHOFFLON et al., 1991). Além dessa, também há evidências de que há aumento da produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por células de sangue periférico em pacientes com EM não tratada (MIRANDOLA et al., 2009)

#### 1.2.4 Monócitos

Uma das características patológicas da EM é a infiltração de monócitos e ativação de macrófagos locais do SNC e de células da microglia (STORCH et al., 1998). Monócitos são células mononucleares derivadas de progenitores mielóides na medula óssea vermelha (BALNER, 1963) que podem representar aproximadamente de 2% a 10% dos leucócitos presentes em sangue periférico (PIERRE, 2002) Através da secreção de citocinas, essas células exercem crítico efeito imunoregulatório (RUDICK, 1992) e, além disso, são capazes de se diferenciar em macrófagos ao ingressar em tecidos, integrando, dessa forma, uma importante linha de defesa contra grande gama de patógenos (VAN FURTH, 1989).

A partir da análise da expressão da família de metaloproteinases (MMP) pelas subpopulações de leucócitos, foram identificadas as MMPs produzidas proeminentemente por monócitos, sendo duas destas (MMP-2 e MMP-14) encontradas em maiores níveis em pacientes com EM do que em indivíduos saudáveis, enfatizando-se os monócitos como as principais células mediadoras da inflamação na EM, contribuindo para o dano à bainha de mielina característico da doença (BAR-OR et al., 2003).

Recentemente, um dos estímulos atribuídos a sua migração pela BHE foi a presença de GM-CSF através da interação com receptor CD116 (GOLDSTEIN et al., 2011), que parece permitir maior influxo de monócitos mesmo que não estimulados, sendo que monócitos ativados via GM-CSF parecem apresentar maior atividade migratória (VOGEL et al., 2015). Além disso, o GM-CSF ativa os macrófagos induzindo um fenótipo mais pró-inflamatório capaz de produzir maiores quantidades de TNF- $\alpha$  do que os macrófagos não estimulados (VOGEL et al., 2015).

Com o aumento da utilização de técnicas para caracterização fenotípica, tem sido possível ampliar os conhecimentos acerca de marcadores celulares e determinar subpopulações de um mesmo tipo celular. Assim, a análise desses marcadores permitiu a identificação de ao menos três fenótipos distintos de monócitos, que parecem influir de diferentes maneiras na progressão de processos inflamatórios. Atualmente, monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> são denominados monócitos clássicos, enquanto que os CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> têm sido relacionados a um maior caráter

inflamatório, tendo, inclusive, sido observada uma ativação preferencial desse fenótipo em pacientes com EM (BRÜCK et al., 1995; CHULUUNDORJ et al., 2014; FISCHER-SMITH, SIDNEY CROUL, ANDRIJ, 2001)

Em estudos *in vitro*, a eliminação de macrófagos produtores de TNF- $\alpha$  demonstrou um efeito benéfico sobre a patogenia e a desmielinização (KÖRNER et al., 1997), uma vez que essa citocina tenha sido relacionada com a produção de danos tanto a oligodendrócitos quanto à bainha de mielina (SELMAJ; RAINE, 1988).

A presença, em altas concentrações, de PAMP's e DAMP's, como a HMGB-1, podem levar a ativação de monócitos a partir da interação com os receptores do tipo Toll, aumentando a capacidade de produção de citocinas como o TNF- $\alpha$  que ainda atua amplificando esse processo de ativação a partir de um feedback positivo e, assim, esses fatores reunidos convergem, promovendo a lesão tecidual (ANDERSSON et al., 2008; HOFMAN et al., 1989; MIRANDA-HERNANDEZ; BAXTER, 2013). Esse DAMP pode ser liberado em situações de estresse celular, como diante de necrose tecidual, induzindo processos inflamatórios (SCAFFIDI; MISTELI; BIANCHI, 2002). Nesse cenário, demonstrou-se que a presença de danos hepáticos após isquemia induzida *in vivo* se relaciona com a ativação de TLR4 por esta proteína (TSUNG et al., 2005), além disso, foi demonstrado que a HMGB1 é também um ligante endógeno de TLR2 (CURTIN et al., 2009) e que sua capacidade de realizar ativação celular e de induzir inflamação de forma semelhante à observada na presença de LPS pode estar relacionada à interação



com os receptores TLR2 e TLR4 (PARK et al., 2006) tendo sido demonstrado que a ativação de NFκB devido a sua presença ocorre via esses dois receptores (PARK et al., 2004). Esses fatores em conjunto, permitiram a consideração de que a HMGB-1 extracelular é um importante regulador da síntese de citocinas pró-inflamatórias por monócitos (ANDERSSON et al., 2000). Já foi observado que pacientes de EM possuem maiores concentrações plasmáticas de HMGB-1 quando comparados indivíduos saudáveis (STERNBERG et al., 2016) e que, além disso, há maiores níveis dessa proteína solubilizada em FCE desses pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis (ANDERSSON et al., 2008).

### 1.3 Vitamina D

#### 1.3.1 Micronutriente e Metabolismo

O composto 1,25-dihidroxicolecalciferol, conhecido como Vitamina D, consiste em um álcool de cadeia fechada e ramificada (LUND; DELUCA, 1966). Esse composto, assim como seus metabólitos, são seco-esteroides, compostos em que um dos anéis ciclopentanoperidrofenantreno, característicos desse grupo, possui uma quebra. Sua importância é bastante conhecida na homeostase do cálcio, sendo sua carência atrelada a diversas patologias associadas a esse sal mineral como raquitismo, retardo no crescimento e maior propensão a fraturas (BLUNT; DELUCA; SCHNOES, 1968; BOONEN et al., 2007) .

A vitamina D existe em 2 formas: vitamina D2 e D3. Plantas e fungos são fontes de ergosterol, que, sob o efeito da radiação UVB, é convertido em ergocalciferol,

ou vitamina D<sub>2</sub>. Sendo assim, através da alimentação é possível obter esse micronutriente, embora só seja possível encontrar níveis satisfatórios em óleos de peixe. Assim, a principal fonte de vitamina D vem da produção endógena na pele após exposição à radiação solar UVB (MORA; IWATA; VON ANDRIAN, 2008)

A partir de estudos em caucasianos, uma forma inativa desse composto, a pré-vitamina D foi identificada na pele, requerendo a interação com radiação ultravioleta para o início de sua conversão, que se dá a partir de sua isomerização, processo lento e termodependente, seguido de associação à proteína ligante de vitamina D que permite a translocação desse composto intermediário para a corrente sanguínea (HOLICK et al., 1980). Após esse contato, é formado um metabólito intermediário que ao chegar no fígado sofre uma hidroxilação, transformando-se em 25-hidroxicolecalciferol (25(OH)D), o principal metabólito intermediário dessa biossíntese (PONCHON; KENNAN; DELUCA, 1969) e forma biologicamente inativa mais abundante no sangue (JOSHI et al., 2011; MARQUES et al., 2010) A metabolização no fígado não é uma etapa regulada e por isso os níveis de 25(OH)D refletem diretamente a quantidade de vitamina D na circulação, que é proporcional à quantidade de vitamina D ingerida e produzida na pele (MARQUES et al., 2010). Nos rins ocorre outra hidroxilação, dando origem a 1,25-dihidroxicolecalciferol (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), forma bioativa dessa molécula com propriedades hormonais (FRASER; KODICEK, 1970).

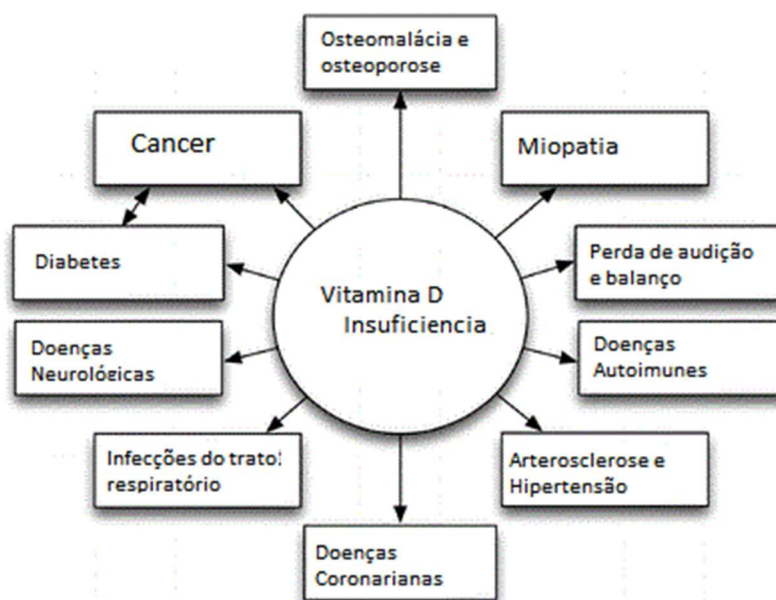
Nos últimos anos, novos papéis foram atrelados à presença dessa vitamina em diferentes sistemas, estando entre eles, o sistema imunológico. Essas mudanças

se devem, parcialmente, a descobertas de que uma grande parte das células e tecidos possuem o receptor para vitamina D e que muitos desses possuem a maquinaria necessária para a conversão enzimática dessa vitamina em sua forma ativa (HOLICK, 2007). Nesse aspecto, tem sido observado um efeito dual deste hormônio sobre o sistema imunológico, que consiste na sua capacidade de atuar estimulando e, paradoxalmente, inibindo as respostas imunes a partir do contato com células desse sistema.

A exemplo dessa capacidade, observou-se que a ativação via TLR de macrófagos expostos à vitamina D com maior expressão de receptores para esse micronutriente e com amplificação do gene vitamina D-1-hidroxilase resultou em aumento do potencial microbicida frente ao *Mycobacterium tuberculosis* a partir da indução da síntese do peptídeo antimicrobiano catelicidina (LIU et al., 2006). Em contrapartida, em células intestinais observou-se uma regulação negativa da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B importante na ativação de diversos genes associados à atividade pró inflamatória pelo receptor de vitamina D (WU et al., 2010).

Na doença de Crohn foram observados efeitos benéficos desse hormônio a partir da indução da expressão de NOD2 e dos efeitos provocados na amplitude da produção de AMP, uma vez que baixos níveis de NOD2 se relacionam com a patogenia dessa doença (WANG et al., 2010). Em outra doença essencialmente inflamatória, o cálcio e a 1,25(OH) $_2$ D $_3$  suprimiram a síndrome do intestino irritável em modelo experimental inibindo a via do TNF- $\alpha$  (ZHU et al., 2005).

Em outro contexto inibitório, a vitamina D foi capaz de inibir a produção de citocinas inflamatórias em monócitos/macrófagos a partir de alterações na enzima MAPK fosfatase-1 (ZHANG et al., 2012). Além disso, monócitos desafiados com LPS ou ácido lipoteicóico em presença de vitamina D tiveram redução na expressão de receptores do tipo Toll e responderam fracamente a padrões moleculares associados à patógenos (SADEGHI et al., 2006). Dessa forma, é possível observar o amplo espectro de ação desse hormônio sobre as atividades regulatórias no sistema imunológico e a capacidade de impactar diversos sistemas, contribuindo para o surgimento de uma ampla gama de doenças (figura 4).



**Figura 4: Contribuição da Vitamina D na etiologia de doenças.** A ingestão insuficiente de Vitamina D parece se relacionar uma ampla gama de condições nas quais distúrbios metabólicos possam contribuir para o surgimento de malignidades(KARLIC; VARGA, 2011) .

### 1.3.2 Vitamina D e as doenças autoimunes

Tem sido observado que doenças autoimunes, como a EM, têm a vitamina D como um possível fator ambiental relevante para sua etiologia e progressão. Diversos estudos apontam um efeito anti-inflamatório da vitamina D promovendo inibição da proliferação de linfócitos T e dos fenótipos Th1 e Th17 e induzindo a atividade de células T reguladoras (CORREALE; YSRRAELIT; GAITAN, 2009) . Entre as células da imunidade inata, sabe-se que a vitamina D é capaz de diminuir a expressão de TLR2, TLR4 e TLR9 em monócitos humanos de forma tempo e dose-dependente (SADEGHI et al., 2006) tal diminuição torna a célula menos responsiva a PAMPs e DAMPs o que pode funcionar como um mecanismo de prevenção da inflamação excessiva mediada pela ativação dos TLR.

Considerando-se a importância de monócitos e macrófagos, no desenvolvimento de doenças inflamatórias determinadas pela atividade de linfócitos T, alguns estudos têm analisado o fenótipo destas células e avaliado a influência da vitamina D no perfil fenotípico destas células em indivíduos com doenças autoimunes. Em um estudo recente, é sugerido que monócitos CD16+ se infiltram no SNC e contribuem para o rompimento da BHE em doenças autoimunes do SNC (WASCHBISCH et al., 2016). Estudos com monócitos do sangue periférico de indivíduos com doenças autoimunes como diabetes do tipo-1, Diabetes Autoimune Latente em Adultos (LADA) e Doença de Bheçet, a adição de vitamina D às culturas de monócitos reduziu a expressão de TLR2 e TLR4 e diminuiu a

produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  em resposta aos agonistas destes receptores (DO et al., 2008; DU et al., 2009).

Embora a vitamina D pareça ser capaz de bloquear a progressão do surto em modelo de encefalomielite (CANTORNA; HAYES; DELUCA, 1996), na EM ainda não são conhecidos os efeitos dessa vitamina sobre o perfil de monócitos

### 1.3.3 – Vitamina D e Mecanismos Epigenéticos

A forma ativa de Vitamina D foi recentemente considerada epigeneticamente ativa (KARLIC; VARGA, 2011). Além disso, Os genes relacionados a sua síntese podem, também, serem reprimidos através de mecanismos epigenéticos por metabólitos intermediários do processo de sua síntese (BURRELL et al., 2011). A 24-hidroxilase, responsável pela degradação da forma ativa da Vitamina D também teve um mecanismo de regulação epigenético demonstrado (BURRELL et al., 2011; NOVAKOVIC et al., 2009).

Assim, esses controles epigenéticos exercidos pela Vitamina D são primariamente observados através de modificações à nível das histonas, especialmente de acetilações. A atividade do VDR, por exemplo, pode ser modulada epigeneticamente por acetilação de histonas (KARLIC; VARGA, 2011).

Dessa forma, diversos estudos corroboram a influencia da Vitamina D em mecanismos epigenéticos. À exemplo, a exposição precoce de

camundongos neonatais à essa vitamina foi considerada essencial para o desenvolvimento adequado de células natural killer invariantes (iNKT) e, além disso, as alterações epigenéticas observadas nessas células diante da deficiência dessa vitamina não puderam ser revertidas após exposição tardia da mesma. Essa informação, sugere que o status de Vitamina D durante o desenvolvimento determina o número de células NKT, que em baixas concentrações se relacionam com doenças autoimunes como a EM (YU; CANTORNA, 2011).

Dentro desse cenário, um dos mecanismos sugeridos para ação da vitamina D sob a EM seria a sua ligação ao VDR levando à supressão da transcrição da citocina pró-inflamatória IL-17, via recrutamento da histona-desacetilase 2 à região promotora desse gene (JOSHI et al., 2011).

Dessa forma, estudos que avaliem a influência da vitamina D no potencial inflamatório tanto por meio de mecanismos epigenéticos quanto no estudo de sua interação com as células propriamente ditas, como o monócito, podem contribuir para a compreensão dos mecanismos imunomodulatórios pelos quais a vitamina D pode afetar o desenvolvimento da EM.

## 2- Justificativa

Entre os aspectos relacionados à imunologia da esclerose múltipla sabe-se que o monócito é uma célula crucial na manutenção do processo inflamatório responsável pelos danos à bainha de mielina. O disparo de cascatas inflamatórias nestas células e o recrutamento delas para o SNC dependem, respectivamente, de receptores como os TLR estimulados por PAMP's e DAMP's, dentre os quais a proteína HMGB-1, encontrada em altas concentrações em pacientes com EM e do receptor (CD116) da citocina GM-CSF. O papel benéfico da vitamina D na EM vem sendo afirmado a partir de diversos estudos que foram concentrados na modulação da atividade de linfócitos T CD4+, no entanto o efeito desta vitamina nas células mais diretamente envolvidas com a geração do dano tecidual, como os monócitos, ainda não havia sido descrito. Ampliar o conhecimento acerca dos efeitos imunomodulatórios da vitamina D na EM é essencial para abalizar o seu uso como terapia adjuvante e assim contribuir para trazer melhores perspectivas de intervenção e tratamento desta doença.



### 3.1- Objetivo geral:

Comparar, entre indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR, o perfil fenotípico de monócitos e avaliar o efeito da vitamina D (1,25(OH)2D3) na modulação da expressão de TLR2, TLR4, CD14, CD16 e CD116 nestas células.

### 3.2- Objetivos específicos:

- Analisar comparativamente entre indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR a expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 em monócitos;
- Analisar comparativamente entre indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR a expressão *in vitro* de TLR2, TLR4 em monócitos na presença ou ausência dos respectivos agonistas;
- Analisar comparativamente entre indivíduos saudáveis e pacientes com EMRR o perfil fenotípico dos monócitos *in vitro* em relação aos níveis de expressão de CD14, CD16 e avaliar em pacientes a expressão do receptor para GM-CSF, CD116;
- Avaliar o efeito da vitamina D na modulação da expressão dos receptores TLR na presença ou ausência de agonistas e no perfil fenotípico dos monócitos de pacientes de EMRR.

## 4- Metodologia

### 4.1- Amostras

A utilização de amostras biológicas proveniente de humanos foi autorizada pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (ANEXO I). Foram convocados a participar do estudo pacientes com Esclerose Múltipla na forma Remitente-Recorrente atendidos no serviço de Neurologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro que tivessem até 60 anos, não estivessem realizando tratamento com interferons, não tivessem realizado pulsoterapia (corticoides) há menos de 30 dias do momento da coleta, não estivessem grávidas, que não tivessem apresentado sinais ou sintomas de infecções no último mês anterior à coleta e não tivessem realizado suplementação com vitamina D há pelo menos 3 meses. Como controle, foram selecionados indivíduos saudáveis, sem EM-RR, que não fizessem suplementação com vitamina D, não possuíssem outras morbidades e que não tivessem utilizado nenhum fármaco com propriedades imunomoduladoras nos últimos quinze dias antes da coleta de amostra.

Para ambos os grupos, foram apresentadas explicações sobre o projeto e um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi assinado por todos os voluntários que aceitaram participar do presente estudo.

As informações coletadas sobre os pacientes estão apresentadas na tabela

1.

Tabela 1: Perfil dos pacientes com EMRR que aceitaram participar do estudo.

<b>Pacientes (n=21)</b>	
Média de idade em anos [média (variação)]	35 (14-52)
EDSS [média (variação)]	1,94 (0-4.5)
Duração da doença em anos [média (variação)]	7.03 (1-15)
Mulheres (%)	80

#### 4.2 – Coleta de sangue e isolamento de monócitos

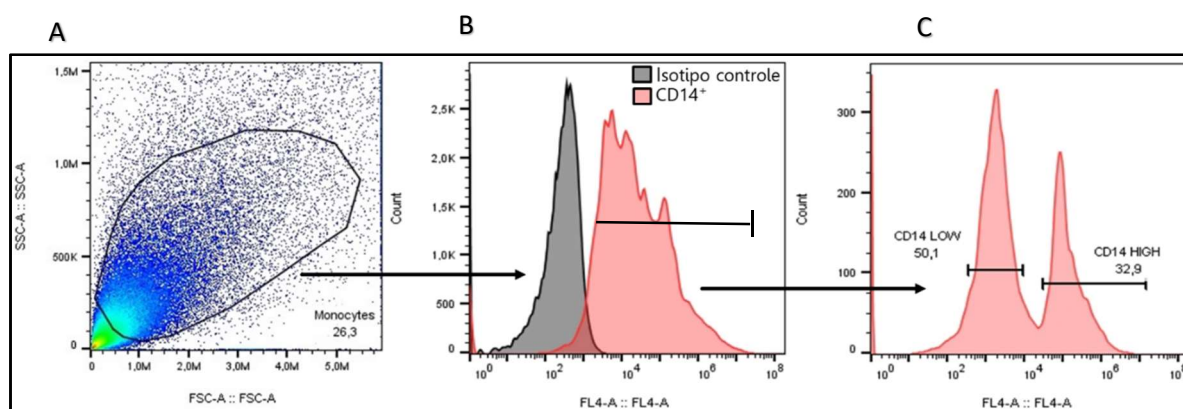
O sangue periférico (40mL) dos voluntários foi coletado por meio de punção venosa em tubos à vácuo heparinizados (Vaccuteiner – BD). O sangue foi depositado lentamente sobre gradiente de densidade Ficoll Paque (GE – Healthcare Life Sciences) em tubo cônico de 50mL na proporção 2:1 (Sangue: Ficoll). Os tubos foram centrifugados a 2000rpm, a 20°C, por 20min em aceleração 7 e desaceleração 2. Ao final da centrifugação, o plasma foi recolhido e congelado e a camada de células mononucleares (PBMC), presente na interface ficoll/plasma, foi coletada por aspiração com pipeta automática de 1000µL e depositada em tubo cônico de 50mL, a esse tubo foram acrescentados 10mL de tampão fosfato salino (PBS –Sigma – Aldrich), e posteriormente o tubo foi centrifugado a 1900rpm, a 20°C, por 6min e o procedimento de lavagem foi repetido mais uma vez. Após as etapas de lavagem, o pellet formado foi ressuspenso em 1mL de meio RPMI 1640 - suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de penicilina e estreptomicina - (Gibco®-Life Technologies). Essas células foram contadas em azul

de tripan 0,4% em PBS em câmara de Neubauer em diluição de 1:100 (suspensão de células: Tripan). Do total de células obtidas no PBMC foi considerado que 8% correspondiam aos monócitos, dessa forma foram distribuídos  $3 \times 10^5$  monócitos em poços de uma placa com 24 poços de fundo chato, que em seguida foi incubada por 1 hora em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C para adesão dos monócitos à placa. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados com PBS à 37°C para remoção das células não aderentes.

#### 4.3 – Ensaio por Citometria de Fluxo

Os experimentos de citometria de fluxo foram realizados em citômetro de fluxo Accuri C6 com o programa de aquisição CFlow (BD – Biosciences). Para cada ensaio foram adquiridos 150.000 eventos de cada amostra e a análise dos dados foi realizada com o software de análise FlowJo V-10.0.8 (Tree Star). Para definição da população celular de interesse foi feito um gate na região de monócitos (Figura 3B), que é caracterizada pelo seu tamanho (FSC- Forward Scatter Cell) e complexidade ou granulosidade (SSC- Side Scatter Cell) específicos. Dentre os eventos contidos nesse gate, foram selecionados aqueles positivos para CD14 (Figura 3B) receptor expresso na membrana plasmática de monócitos (YANG et al., 2014), células dendríticas CD1c+ (HUMAN et al., 2014) e linfócitos B (VITAO; LABETA, 1994). Para as análises do nível de expressão de CD14, foi feito um gate na região das células CD14+ e dentre os eventos contidos nesse gate foram

analisadas as intensidades de fluorescência indicativas de alta e baixa expressão deste marcador (Fig. 4C). Cada variável estudada foi analisada, portanto, na população celular CD14<sup>+</sup> na região de monócitos e em cada análise foi respeitado o mesmo número absoluto de células CD14<sup>+</sup> para comparação das variáveis.



**Figura 5: Definição da população celular a ser estudada.** Para todos os ensaios de citometria de fluxo foram adquiridos 150.000 eventos e foi feito um gate (A) na região de monócitos e nesse gate foram selecionadas as células CD14<sup>+</sup> (B) onde foi feita a coleta de dados referente a cada experimento. Entre as células CD14<sup>+</sup> foram selecionadas as células CD14<sup>low</sup> e CD14<sup>high</sup> (C).

#### 4.3.1 - Avaliação da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos *ex vivo*

Após o isolamento, as placas foram preenchidas com solução de lavagem (PBS + SFB 1%) e submetidas a baixas temperaturas (0<sup>o</sup>-4<sup>o</sup>C). Por meio da utilização de Cell scrapers foi realizada a remoção dos monócitos aderidos aos poços e em seguida a suspensão de células formada foi transferida para microtubos de 1,5mL. Em seguida, os monócitos foram mantidos a 4<sup>o</sup>C por 30 minutos na presença de anticorpos monoclonais: anti-CD14-PE, anti-TLR2 –FITC, anti-TLR4 – FITC (Biolegend), ao fim desse tempo, os monócitos foram lavados duas vezes com 1mL de PBS acrescido de 1% de SFB em centrifugação à 4<sup>o</sup>C, por 7 minutos

em 1900rpm, finalmente as células foram ressuspensas em 200µL de PBS 1% SFB 4% paraformaldeído para leitura no citômetro.

O nível de expressão de cada receptor na superfície do monócito foi determinado pela intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pelo fluorocromo com o qual o monoclonal foi conjugado entre as células CD14+.

#### 4.3.2 – Avaliação da expressão de moléculas de superfície em monócitos *in vitro*

Após o isolamento, as placas de cultura contendo os monócitos isolados foram acrescidas de 500µL de meio RPMI com ou sem adição de vitamina D (1, 25 di-hidroxi vitamina D3 - Sigma) nas concentrações de  $10^{-11}$  M,  $10^{-9}$ M e  $10^{-7}$ M seguindo-se incubação por 48h em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As culturas que receberam estímulos, agonista de TLR2, Palmitoyl (3)-Cys-Ser-Lys (4)-OH (Pam3Cys - Invivogen), na concentração de 5µg/ml (Sigma), e agonista de TLR4, LPS, na concentração de 10ng/ml (Sigma), permaneceram incubadas nas mesmas condições anteriormente citadas por 24h.

Ao fim da incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados sob congelamento a -4°C. As placas foram preenchidas com solução de lavagem (PBS + SFB 1%) e submetidas a baixas temperaturas (0°-4°C). Por meio da utilização de Cell scrapers foi realizada a remoção dos monócitos aderidos aos poços e em seguida a suspensão de células formada foi transferida para tubos de 1,5mL. Em seguida, os monócitos foram mantidos a 4°C por 30 minutos na presença de anticorpos monoclonais: anti-CD14-APC, anti-CD14-PE, anti-TLR2 -FITC, anti-

TLR4 – FITC, anti-CD16- PE e anti-CD116-FITC (Biolegend), e o procedimento de lavagem para retirada do excesso de anticorpos foi realizado como citado anteriormente no item 4.3.1.

O nível de expressão de cada receptor na superfície do monócito foi determinado pela intensidade média de fluorescência (MFI) emitida pelo fluorocromo com o qual o monoclonal foi conjugado entre as células CD14+.

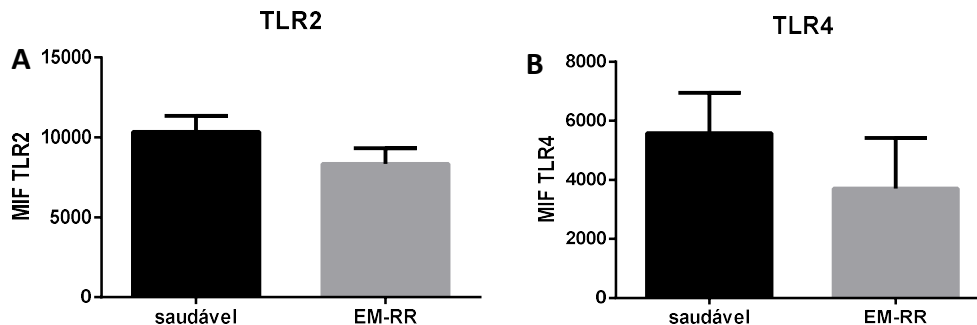
#### 4.4- Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados com o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, inc.). As amostras utilizadas no estudo foram pareadas de acordo com idade e gênero, visando à redução de interferências sobre as variáveis. Dessa forma, para comparação das médias entre as variáveis analisadas foi empregado o teste ANOVA one way com pós teste de Tukey e para comparação entre grupos foi empregado o T de Student, todos com intervalo de confiança bilateral de 95%, logo, foi considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ . Nos gráficos, os dados foram representados por média e erro padrão da média.

## 5. Resultados

### 5.1. Comparação da expressão *ex vivo* de TLR2 e TLR4 entre monócitos de pacientes com EMRR e de indivíduos saudáveis

Primeiramente, desejava-se saber se haveria diferença na expressão basal desses receptores entre pacientes e indivíduos saudáveis. Assim, após recuperação dos monócitos entre as células mononucleares aderentes obtidas de indivíduos saudáveis e de pacientes com EMRR, a expressão de TLR2 e TLR4 nestas células, CD14+, entre os 2 grupos foi comparada e diferenças significativas não foram observadas (Fig. 5)

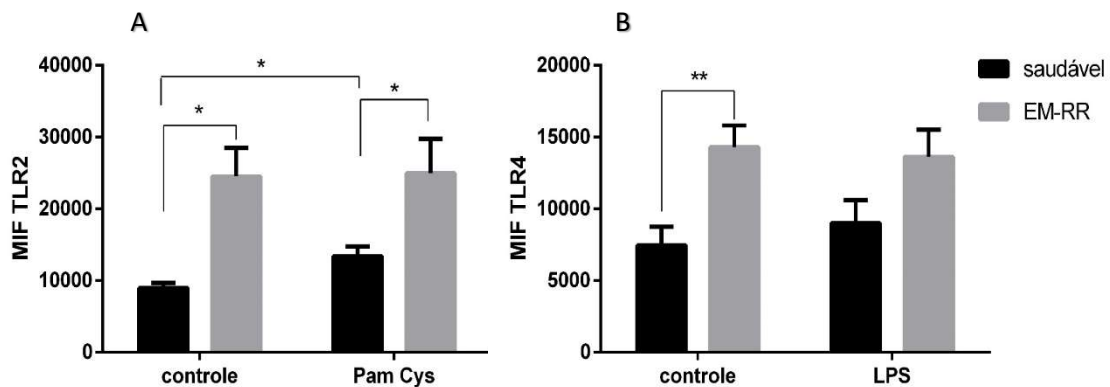


**Figura 6: Nível de expressão dos receptores TLR2 (A) e TLR4 (B) em monócitos de pacientes com EM-RR e de voluntários saudáveis.** A intensidade média de fluorescência (MIF) do isotiocianato de fluoresceína (FITC) entre as células CD14+ incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 e anti-TLR4 conjugados ao (FITC) foram analisadas por citometria de fluxo e comparadas entre os grupos. Não houve diferença significativa na expressão desses receptores entre os monócitos dos 2 grupos estudados para  $p < 0,05$  ( $n=6$ ).

A expressão desses receptores também foi avaliada *in vitro* e comparada entre os grupos em nível basal, apenas meio de cultura sem estímulo, e após ativação dos monócitos com Pam3Cys e LPS, agonistas de TLR2 e TLR4, respectivamente.



Após 24h na presença ou ausência dos estímulos, observou-se que monócitos de indivíduos saudáveis apresentaram menor expressão basal de ambos os receptores quando comparados aos monócitos de pacientes com EM-RR (Fig. 7A e 7B). Os monócitos de indivíduos saudáveis ainda foram capazes de elevar a expressão de TLR2 após a exposição ao Pam3Cys, o que não foi observado nos monócitos de pacientes, interessante, no entanto, a expressão aumentada de TLR2 nas células ativadas dos indivíduos saudáveis ainda é significativamente inferior à expressão deste receptor nas células de pacientes (Fig. 7A). Já a expressão do TLR4 não se alterou em função do estímulo com LPS em nenhum dos grupos avaliados, se mantendo mais elevada nos monócitos de pacientes também após a ativação destas células (Fig. 7B).



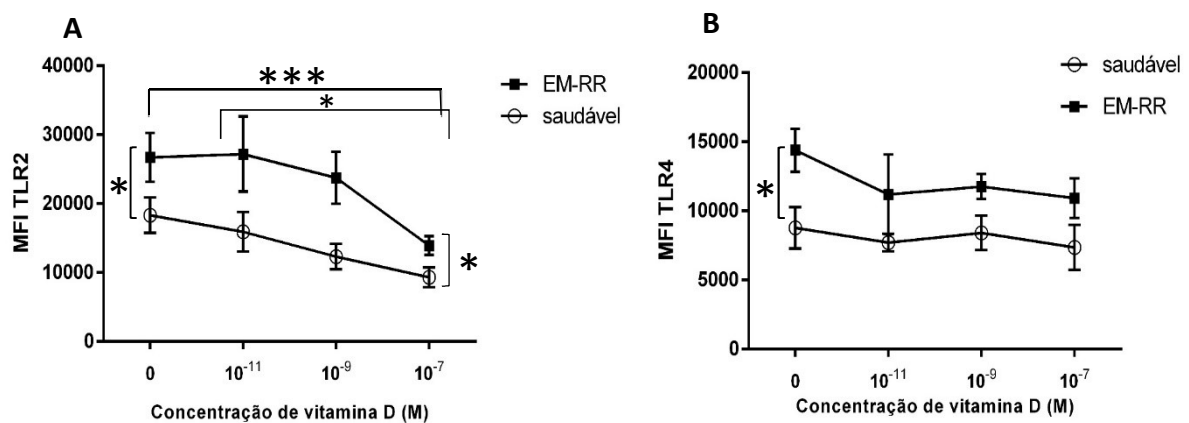
**Figura 7: Comparação da expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos ativados ou não com Pam3Cys e LPS entre os grupos de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR.** Os monócitos foram mantidos por 48h em cultura e estimulados ou não com Pam3Cys (5µg/mL) ou LPS (10ng/mL) por 24h. A MIF do FITC entre as células CD14+ incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 (A) e anti-TLR4 (B) conjugados ao FITC foram analisadas. Foi observado aumento da expressão de TLR2 em monócitos não ativados e ativados entre pacientes e indivíduos saudáveis e em indivíduos saudáveis também foi observado aumento entre monócitos não ativados e ativados. Foi observada maior expressão de TLR4 em monócitos não ativados de pacientes em relação a indivíduos saudáveis. Diferenças estatísticas com  $p < 0,05$  representadas por \*. (n=8)

## 5.2. Efeito da vitamina D sobre a expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EMRR e de indivíduos saudáveis

Primeiramente foi realizada uma curva dose-resposta a fim de investigar se a vitamina D poderia modular a expressão desses receptores de padrão nos monócitos e em quais concentrações.

O efeito da vitamina D sobre a expressão basal de TLR2 e TLR4 foi avaliado após incubação dos monócitos com concentrações crescentes da vitamina por 48h.

Como demonstrado nos gráficos seguintes, a vitamina D na concentração de  $10^{-7}M$  foi capaz de reduzir o nível de expressão basal de TLR2 tanto no grupo de indivíduos saudáveis quanto entre pacientes com EMRR. No entanto, não houve efeito de nenhuma das concentrações da vitamina D sobre a expressão basal de TLR4 em nenhum dos dois grupos analisados (Fig. 8). A partir deste resultado, a concentração de  $10^{-7}M$  de vitamina D foi empregada nas demais análises.

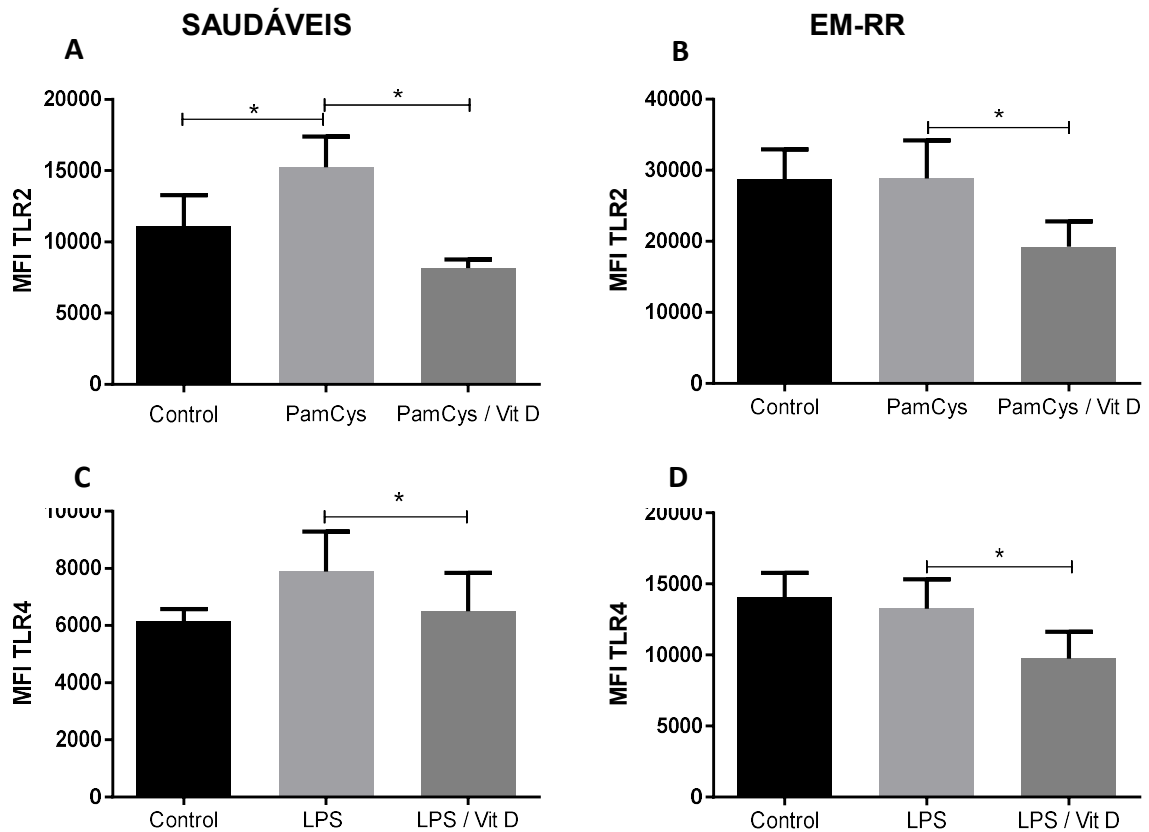


**Figura 8: Efeito da vitamina D sobre a expressão dos receptores TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EM-RR e de voluntários saudáveis.** Os monócitos foram incubados por 48h na ausência ou na presença de concentrações crescentes de vitamina D e a MIF do FITC entre as células CD14<sup>+</sup> incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 (A) e anti-TLR4 (B) conjugados ao FITC foram analisadas. Foram observadas diferenças na expressão de TLR2 entre a concentração de 0M e  $10^{-7}M$  de vitamina D; entre  $10^{-11}M$  e  $10^{-7}M$  no grupo de pacientes; entre os dois grupos na concentração de 0M e  $10^{-7}M$ . Foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos na

concentração de 0M de vitamina D. Diferenças estatísticas com  $p < 0,05$  representadas por \* e \*\*\* (n=8).

Uma vez determinada a concentração de vitamina D capaz de inibir a expressão basal de TLR2, foi decidido então estudar o efeito da vitamina D sobre a modulação da expressão dos receptores TLR2 e TLR4 após ativação dos monócitos com seus respectivos agonistas.

Como demonstrado na Figura 9, a pré-exposição à vitamina D inibiu o aumento da expressão de TLR2 induzida pelo Pam3Cys nos monócitos de indivíduos saudáveis (Fig.9A). Nos monócitos de pacientes, embora o agonista não tenha elevado a expressão do TLR2, a vitamina D reduziu a expressão deste receptor mesmo nas células ativadas (Fig. 9B). De forma interessante, embora a vitamina D não reduza os níveis basais de TLR4 como já havia sido observado e demonstrado na figura 8B, ela foi capaz de reduzir a expressão deste receptor em células ativadas com LPS, tanto de indivíduos saudáveis, quanto de pacientes. Denotando um possível efeito anti-inflamatório da vitamina D in vitro pela redução da expressão dos receptores de padrão investigados no presente estudo.

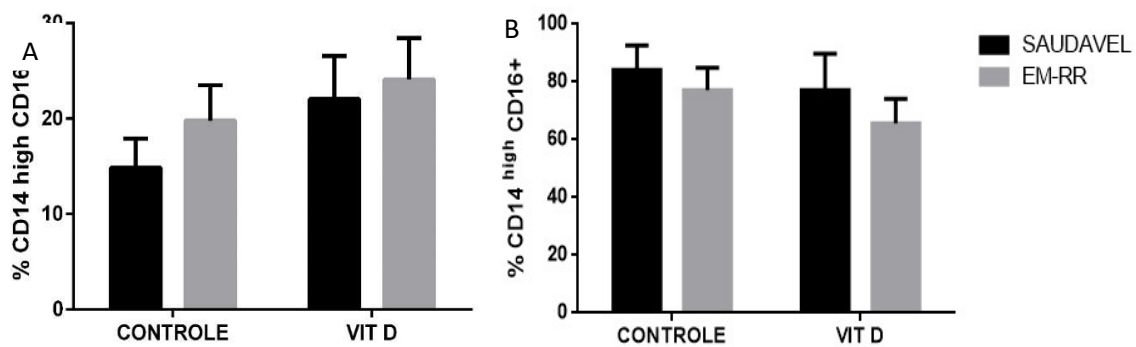


**Figura 9: Efeito de agonistas e da vitamina D na expressão de TLR2 e TLR4 em monócitos de indivíduos saudáveis e de pacientes com EM-RR.** Os monócitos foram pré-expostos ou não à vitamina D ( $10^{-7}M$ ) por 48h e incubados na ausência (controle) ou presença de Pam3Cys ( $5\mu g/mL$ ) ou LPS ( $10ng/mL$ ) por 24h. A MIF do FITC entre as células CD14<sup>+</sup> incubadas com anticorpos monoclonais anti-TLR2 (A) e anti-TLR4 (B) conjugados ao FITC foram analisadas. Diferenças estatísticas com  $p < 0,05$  representadas por \*. (n=7).

5.3. Comparação da frequência de fenótipos de monócitos entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM-RR.

Visto que a vitamina D foi capaz de inibir o aumento de expressão de TLR nos monócitos totais de pacientes e indivíduos saudáveis, foi decidido avaliar se, Após a incubação dos monócitos na presença ou ausência de vitamina D poderia ocorrer alteração da frequência de fenótipos distintos de monócitos. Ao fim do tempo de

incubação, os monócitos foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD14-APC e anti-CD16-PE, foram analisadas as frequências fenotípicas das subpopulações CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 10), sem que tivessem sido encontradas diferenças significativas nesses parâmetros para os dois grupos amostrais estudados, assim como também não foi observado efeito modulador da vitamina D sobre a frequência destes fenótipos (Figura 10). Demonstrando, dessa forma, que a vitamina D pode ter efeito anti-inflamatório apenas na modulação da expressão de receptores de padrão, e não uma influência na frequência fenotípica de células pró-inflamatórias.

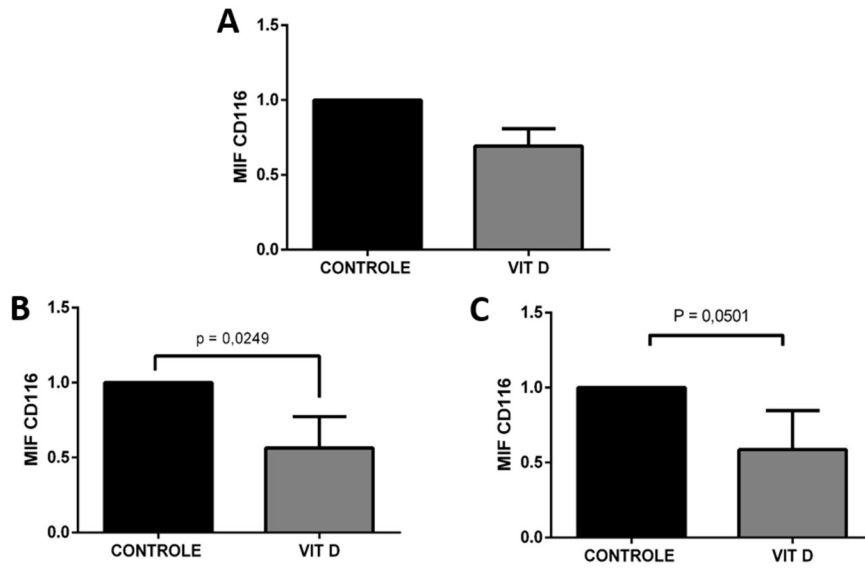


**Figura 10: Frequências das subpopulações de CD14<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup> e CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> em monócitos de pacientes com EMRR e controles saudáveis.** Os monócitos foram incubados por 48h na ausência ou na presença de vitamina na concentração de 10<sup>-7</sup>M e as células foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD14 conjugado a APC e anti-CD16 conjugados ao PE. As subpopulações foram caracterizadas pela MIF dos fluorocromos e as frequências foram analisadas. Não foram observadas diferenças significativas na frequências das subpopulações para p<0,05 (n=4).

#### 5.4. Efeito da vitamina D sobre a expressão de CD116 em monócitos de pacientes com EM-RR

Dado que a vitamina D foi capaz de influenciar a expressão de receptores relacionados à inflamação, mas não demonstrou modular a frequência de fenótipos distintos de monócitos, foi decidido avaliar mais um receptor expresso por monócitos que está envolvido na resposta inflamatória da esclerose múltipla. Para tanto, após incubação com a vitamina D por 48h, foi analisada em monócitos de pacientes com EMRR a modulação da expressão de CD116, receptor para GM-CSF, citocina produzida pelos linfócitos T encefalitogênicos e responsável pela migração dos monócitos através da BHE (VOGEL et al., 2015).

Os dados demonstraram a diminuição da expressão deste receptor nas células CD14<sup>high</sup> expostas à vitamina D e uma tendência a este mesmo efeito nas células CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> (Figura 11). Sendo assim, mais uma vez a vitamina D se mostrou capaz de inibir a expressão de receptores em monócitos relacionados à resposta inflamatória da esclerose múltipla.



**Figura 11: Intensidade média de fluorescência de CD116 nas subpopulações de CD14+, CD14<sup>high</sup> e CD14<sup>high</sup>CD16+ em monócitos de pacientes com EMRR.** Os monócitos foram incubados por 48h na ausência ou na presença de vitamina na concentração de 10<sup>-7</sup>M e a MIF do FITC entre as células CD14+ (A), CD14<sup>high</sup> (B) e CD14<sup>high</sup>CD16+ (C) foram analisadas. Não foi observado efeito da vitamina D na expressão de CD116 nas células CD14+, enquanto que nas populações CD14<sup>high</sup> e CD14<sup>high</sup>CD16+ foi observada a redução na expressão desse receptor para p<0,05 (n=4).

## 6- Discussão

Sabe-se que a principal característica fisiopatológica da EM é a inflamação, logo, vias que levam a exacerbação desses processos no SNC, ganham destaque. Assim, a ativação de células residentes desse sistema facilita e permite a formação de novas lesões (PRINZ et al., 2006). Os receptores do tipo Toll estão presentes em células da glia e como componentes do sistema imune inato são responsáveis por iniciar respostas contra patógenos. A presença de infecções no SNC tem sido apontada ao longo dos últimos anos como fator de risco para o desenvolvimento de EM, uma vez que a ativação de TLRs por PAMPs e DAMPs pode aumentar a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e engajar uma série de vias de sinalização intracelular para regular a natureza, magnitude e duração da resposta inflamatória do hospedeiro (BROWN et al., 2011). Dessa forma, a participação dos receptores do tipo Toll na ativação de células do sistema imune inato associada a essa produção de citocinas tem sido indicada como um fator responsável por contribuir para o desenvolvimento ou exacerbação de eventos autoimunes (OLSON; MILLER, 2004).

Nesse contexto, Do e colaboradores (2008) não observaram diferença significativa na expressão *ex vivo* de TLR2 e de TLR4 entre monócitos isolados de indivíduos saudáveis e pacientes com psoríase e doença de Behçet inativa. Da mesma forma, em nosso estudo *ex vivo* realizado com monócitos de pacientes com EMRR não observamos diferenças significativas entre as células oriundas de pacientes em comparação com as de indivíduos saudáveis. Em contrapartida, no



trabalho realizado com monócitos isolados também à fresco de pacientes com LADA e *Diabetes Melitus* do Tipo I (DMT1) foi observada maior expressão de TLR4 em pacientes, tanto de LADA quanto de DMT1, quando comparados a indivíduos saudáveis e nenhuma diferença significativa na expressão de TLR2 entre os grupos analisados (DU et al., 2009b). Outro grupo de pesquisadores verificou relação entre TLR2 e TLR4 na patogenia da artrite juvenil idiopática (AJI) e do lúpus eritematoso sistêmico (LES), onde não houve diferença significativa na expressão de TLR2 entre pacientes de ambas as doenças e indivíduos saudáveis o que também foi observado em nosso trabalho (KIRCHNER et al., 2013). Enquanto isso, para TLR4 se observou redução dos níveis de expressão nos pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis, diferindo do que encontramos em nosso estudo. Dessa forma, é possível que o nível de expressão *ex vivo* ao menos do TLR4 em monócitos possa apresentar variações de acordo com a morbidade apresentada ao se relacionar com o processo inflamatório característico de cada doença, podendo até mesmo o curso da doença interferir na modulação dessa expressão, embora Kirchner e colaboradores (2013) tenha observado que pacientes em surto não apresentaram diferenças na expressão de ambos os receptores na superfície dos monócitos quando comparados a pacientes em remissão. Hamid e colaboradores (2016) ao quantificarem RNAm de TLR4 a partir de PBMC obtido de pacientes com EMRR observaram menores níveis nos pacientes em relação à indivíduos saudáveis. No presente estudo, embora a expressão *ex vivo* dos receptores não tenha sido estatisticamente diferente entre indivíduos portadores de

EM e indivíduos saudáveis, foi possível observar uma tendência à menor expressão desses receptores nos pacientes, como observado em alguns desses estudos. Sabe-se que distúrbios autoimunes como a EM estão associados a maiores níveis séricos de PAMPs e DAMPs como a HMGB-1 quando comparados com os níveis de indivíduos saudáveis (MALHOTRA et al., 2015). Dessa forma, essa maior disponibilidade de ligantes pode gerar mais interações com esses receptores, culminando, assim, na internalização dos mesmos e acarretar a expressão reduzida observada nesses trabalhos. Além disso, até mesmo os medicamentos podem ser capazes de influenciar na regulação dos níveis de expressão desses receptores, visto que já foi demonstrado que o tratamento com Copaxone promove redução da responsividade de monócitos quando estimulados com agonistas de TLR2, TLR4 e TLR5 (WEBER et al., 2004).

Em contrapartida, nos experimentos conduzidos *in vitro* observamos maiores expressões de TLR2 e TLR4 nos monócitos de indivíduos com EMRR quando comparados a indivíduos saudáveis. Em comum com nosso estudo, foi observado que as expressões de TLR2 e TLR4, assim como de proteínas envolvidas nas suas vias de sinalização, encontram-se aumentadas em monócitos de pacientes com DMT1, e que esse aumento contribui para exacerbação do quadro inflamatório (DEVARAJ et al., 2008) .

Em nosso estudo foi observado que a ativação dos monócitos com agonista de TLR2 induziu o aumento da expressão deste receptor apenas nos indivíduos saudáveis, enquanto que o estímulo com LPS não modulou a expressão de TLR4

em nenhum dos grupos. Esses dados se aproximam do que foi observado em um trabalho no qual foi relatado haver aumento da expressão de RNAm para TLR2 em leucócitos ativados de indivíduos saudáveis sem que o mesmo tivesse sido observado nas células de pacientes com artrite reumatoide (RA) e osteoartrite. Nesse mesmo trabalho também não houve a modulação da expressão de RNAm para TLR4 nem em saudáveis nem em indivíduos com RA, tendo sido sugerido que tal observação tenha sido possível pois talvez as células com maior potencial de resposta e produção de citocinas já houvessem sido recrutadas para os sítios de inflamação, de forma que ao coletar células do sangue periférico, apenas aquelas menos reativas podem ter sido disponibilizadas. (KOWALSKI et al., 2008). Juarez e colaboradores (2010) observaram que o aumento mais pronunciado da expressão de TLR4 na presença de LPS em monócitos e em macrófagos alveolares ocorreu com um período de incubação de 10 minutos enquanto que em nosso trabalho esse experimento foi realizado com 24h de incubação com esse agonista. Essas diferenças nas condições de cultura podem, portanto, também ser um fator que contribuiu para o resultado que observamos em nosso trabalho.

A capacidade de interação do metabólito ativo da vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D<sub>3</sub>) com leucócitos como o monócito é conhecida já há bastante tempo (PROVEDINI et al., 1983) e desde então outros trabalhos demonstraram a influência dessa vitamina sobre o sistema imune, descrevendo mecanismos pelos quais ela exerce efeitos anti-inflamatórios, inclusive, aqueles que envolvem a modulação da expressão de receptores TLR. SADEGHI e colaboradores (2006)

analisaram monócitos humanos submetidos a concentrações crescentes de vitamina D3 em cultura por 48h e observaram redução da expressão de TLR4 e TLR2 tornando as células menos responsivas aos PAMPs, efeito que também foi observado em monócitos humanos da linhagem THP-1 por VERMA e colaboradores (2014). Embora o conhecimento sobre a importância da Vitamina D em diversos processos fisiológicos esteja consolidada, ainda se encontra em debate quando seus efeitos são benéficos ou deletérios. Assim, a investigação do seu potencial terapêutico em doenças inflamatórias tem sido estudada de forma crescente.

Em um estudo randomizado realizado por Manousaki e colaboradores. (2017) a Vitamina D foi associada a melhora no combate a infecções respiratórias, da função pulmonar e em mecanismos de imunomodulação. Em outro trabalho, realizou-se cohort de 10 anos a fim de se estabelecer relação entre os níveis plasmáticos dessa vitamina e aumento da susceptibilidade a sensibilização alérgica, infecções do trato respiratório e desenvolvimento de asma, tendo sido encontrada relação inversamente proporcional entre as concentrações desse micronutriente e o risco de desenvolvimento de asma na primeira década de vida (HOLLAMS et al., 2017). Na aterosclerose, outra doença de caráter inflamatório, a vitamina D demonstrou reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, levou à redução de células efetoras inflamatórias em placas ateroscleróticas e ainda foi capaz de aumentar o número de células T regulatórias (TAKEDA et al., 2010). No que tange à EM diversos estudos relatam a presença de menores dosagens de

Vitamina D na circulação de pacientes e associam maiores níveis plasmáticos a um caráter protetor em relação as suas manifestações. Nesse contexto, O principal mecanismo sugerido pelo qual a insuficiência de vitamina D contribui para a patogênese da EM é através da sua ação imunomoduladora que vem sendo demonstrada em estudos *in vivo* (MAHON *et al.*, 2003) e *in vitro* (CORREALE *et al.*, 2009). Em trabalho realizado com pacientes brasileiros a partir do isolamento de PBMC foi possível concluir que a adição da forma ativa dessa vitamina às culturas foi capaz de reduzir a proporção de células T patogênicas e, além disso, nesse estudo foi observado que a maior parcela dos pacientes participantes possuía deficiência periférica dessa vitamina (DA COSTA *et al.*, 2016). Com esse conjunto de achados somados às evidências de que a vitamina D é capaz de exercer modulação em monócitos via TLR procuramos avaliar se esses efeitos também poderiam ocorrer em monócitos de pacientes com EM, o que nos levou a realizar a elaboração de uma curva de concentração de vitamina D a fim de verificar se haveria algum efeito na expressão basal dos receptores TLR2 e TLR4 em monócitos de pacientes com EMRR. Dessa forma, observamos uma redução dose-dependente estatisticamente significativa na expressão de TLR2 tanto no grupo de pacientes quanto no de indivíduos saudáveis, embora, mesmo na maior concentração utilizada ( $10^{-7}$  M), a expressão deste receptor ainda se manteve maior no grupo de indivíduos com EM. Esse mesmo papel da vitamina D foi avaliado no estudo de Do e colaboradores (2008) com monócitos de pacientes com doença de Behçet, onde foi observado um comportamento dose-dependente da redução da

expressão tanto para TLR2 quanto para TLR4 em monócitos de todos os grupos de estudo, sendo eles pacientes com doença de Behçet ativa, voluntários saudáveis e linhagem celular monocítica humana (THP-1) enquanto que em nosso trabalho só foi observada diferença significativa na expressão de TLR2. O tempo de incubação utilizado com esse micronutriente foi o mesmo empregado em nosso trabalho (48h), tendo a diferença observada sido, talvez, devido ao reduzido número amostral que nosso trabalho possui em comparação com o utilizado por esses pesquisadores.

Nossos dados demonstram que em células ativadas houve redução da expressão tanto de TLR2 quanto de TLR4 frente à pré-incubação com vitamina D, tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com EMRR. Assim, foi possível perceber que mesmo diante da presença dos agonistas desses receptores, a vitamina D foi capaz de inibir a expressão desses receptores, sugerindo mais um mecanismo pelo qual esse micronutriente possa exercer seu papel antiinflamatório nessa patologia, como foi visto por Li e colaboradores (2013) que, em modelo experimental murino de EM observaram inibição da expressão de TLR8 e da proteína adaptadora da via de sinalização MyD88, a mesma utilizada por TLR2 e TLR4, na presença de vitamina D, e ainda demonstraram que esse micronutriente promove o mesmo efeito em THP-1, uma linhagem de monócitos humanos. Assim, observa-se que todos os dados apontam para redução da resposta inflamatória pela vitamina D atuando na sinalização e expressão de TLR.

Nossos resultados condizem com estudos prévios realizados em que se observa que maiores níveis plasmáticos de vitamina D parecem se relacionar à redução do risco de surtos em EMRR, o que pode ser atrelado a mecanismos anti-inflamatórios pelos quais ela consiga promover esse efeito (RUNIA et al., 2012). Até então, os estudos em EM que apontam mecanismos pelos quais estes efeitos anti-inflamatórios da vitamina D ocorrem foram desenvolvidos *in vitro* em células dendríticas e linfócitos T majoritariamente, tendo sido demonstrada a atenuação da produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T CD4 e o favorecimento de células tolerogênicas (CORREALE; YSRRAELIT; GAITÁN, 2009; DA COSTA et al., 2016). De forma geral, a vitamina D tem sido atrelada a um efeito anti-inflamatório que sugere que a correção da sua deficiência possa ser útil para suprimir eventos autoimunes como os observados em pacientes com EMRR. A indução de células dendríticas tolerogênicas foi um destes efeitos que foi demonstrado também *in vivo*, promovendo inibição da EAE através do aumento da proporção de células T regulatórias e a redução da infiltração de células Th1 e Th17 pela medula espinhal (XIE et al., 2017). Outras evidências do potencial anti-inflamatório da vitamina D em doenças autoimunes foram demonstradas pela correlação entre maiores níveis plasmáticos desse composto e menor atividade da doença em pacientes com LES (AMITAL et al., 2010). Na mesma linha de estudo, a vitamina D também parece exercer efeito imunomodulatórios em poliartrite, sendo os níveis plasmáticos de seu metabólito inversamente proporcional à atividade da doença (PATEL et al., 2007). Nesse cenário, nosso estudo é um dos primeiros a apontar a vitamina D como um

potente inibidor da expressão de receptores TLRs em células de pacientes com EMRR.

Monócitos podem ser divididos em diferentes subpopulações baseado na presença dos marcadores de superfície CD14 e CD16 (ZIEGLER-HEITBROCK, 1996). Os diferentes fenótipos encontrados em diferentes condições patológicas têm sido relacionados a diferentes desfechos clínicos e por vezes, atrelados a maior susceptibilidade a prognósticos ruins. Após acidente vascular cerebral (AVC), por exemplo, já foi observado aumento da proporção de monócitos CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> com decréscimo de monócitos CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. Nesse cenário, o fenótipo CD14<sup>high</sup>CD16<sup>-</sup> foi associado a prognósticos ruins, aumento da mortalidade e piora clínica precoce. Em contrapartida, monócitos CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> foram relacionados a menores índices de mortalidade e CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> foram associados a menores áreas de infarto, produzindo assim melhores desfechos clínicos (URRA et al., 2009). Em modelo murino de EM (EAE) foi observado que monócitos inflamatórios (IMC) possuem a capacidade de suprimir a atividade de linfócitos T e de induzir a apoptose dessas células a partir da produção de óxido nítrico (NO) (ZHU et al., 2007), o que inserido no contexto de EM possui grande relevância, visto que essas células são as principais envolvidas nos processos que levam a degeneração neuronal e, por consequência, às morbidades associadas à doença. Em outra análise foi observado que monócitos CD16<sup>+</sup> em modelo de doenças inflamatórias possuíam maior expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade, atrelando-as a um maior caráter inflamatório, dada sua maior capacidade de apresentar antígenos e



assim ativar linfócitos T (YANG et al., 2014). Chuluundjorj e colaboradores (2014) observaram que monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> eram ativados e expandidos preferencialmente durante surtos de EM. Em nosso trabalho não foi possível observar diferenças significativas estatisticamente na frequência de nenhum desses fenótipos entre pacientes e indivíduos saudáveis, assim como também não houve modulação destas frequências na presença da vitamina D, sendo válido ressaltar que devido à dificuldade em conseguir pacientes voluntários a doar sangue para o estudo que estivessem dentro dos critérios de inclusão no trabalho, essas análises foram realizadas em um pequeno grupo de pacientes e talvez esse cenário pudesse ser diferente se fosse analisado um grupo maior, uma vez que já foi observado em outro trabalho que a vitamina D in vitro foi capaz de reduzir a frequência de monócitos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> e CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> em pacientes asmáticos quando comparados a controles saudáveis (GRUBCZAK et al., 2015). Nesse sentido, pode ser necessário continuar essa investigação com maior grupo de estudo a fim de elucidar se o mesmo fenômeno observado por Grubczak e colaboradores (2015) é capaz de ocorrer em pacientes com EM ou se, de fato, há diferença no comportamento observado em monócitos de pacientes asmáticos.

A citocina GM-CSF foi definida previamente como fator de crescimento hematopoiético (BURGESS; METCALF, 1980) e, hoje, possui outros papéis conhecidos, tais como a mobilização de células do sistema imune, sendo responsável pelo controle numérico de macrófagos em diversos tecidos, por exemplo (BENNETT, 1996). Além disso, essa citocina é expressa em altos níveis

em sítios de inflamação, como em fluidos sinoviais de pacientes com RA devido a sua capacidade de atrair células de origem mielóide como também de induzir a sobrevivência e ativação destas células, contribuindo para o aumento da inflamação (CORNISH et al., 2009). No cenário da EM, a citocina GM-CSF adquire grande importância devido ao fato de monócitos ativados por ela adquirirem a capacidade migrar através da BHE, possivelmente devido à grande produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, sua produção, muitas vezes atribuída aos linfócitos T encefalitogênicos, também já foi observada sendo realizada por macrófagos e pela microglia (VOGEL et al., 2015c). Outro aspecto marcante é o aumento da presença de células B produtoras de GM-CSF em pacientes de EM (LI et al., 2015). Diferentes fenótipos de monócitos possuem diferentes padrões de migração (GEISSMANN; JUNG; LITTMAN, 2003) e podem, além disso, responder de diferentes formas à GM-CSF (FLEETWOOD et al., 2007). Nesse contexto, buscamos investigar se o receptor para GM-CSF, CD116, teria sua expressão modulada pela vitamina D nas diferentes subpopulações de monócitos em pacientes com EMRR. De maneira interessante, a expressão desse receptor nas subpopulações CD14<sup>high</sup> e CD14<sup>high</sup>CD16<sup>+</sup> foi sensível à vitamina D, sendo reduzida nas células expostas a ela. Parajuli e colaboradores (2014) observaram que células da microglia de camundongos quando ativadas por LPS sob estímulo de GM-CSF apresentavam a expressão de TLR4 aumentada, mostrando que talvez seja possível que essa convergência de sinalização seja necessária para que o LPS aumente a expressão de TLR4, dado que em estudos anteriormente citados esse

efeito não pôde ser observado. Nossos dados demonstraram que a vitamina D leva à redução da expressão do receptor de GM-CSF, CD116, nos monócitos de pacientes com EMRR nas subpopulações CD14<sup>High</sup> e CD14<sup>High</sup>CD16<sup>+</sup>, fenótipos esses mais pró-inflamatórios. Considerando o trabalho de Parajuli e colaboradores (2014), pode-se então especular que a vitamina D poderia então atuar na EM, dentre outras formas, inibindo a expressão de CD116 na micróglia e em monócitos e dessa forma, indiretamente, reduzir a expressão de TLR4 nessas células e assim reduzir a inflamação e o recrutamento de monócitos no SNC. Dessa forma, pode-se sugerir que as modulações na expressão de receptores implicados no perfil inflamatório da EM observadas na presença da vitamina D em nosso estudo possam ter efeito benéfico na prática clínica atenuando a sintomatologia e melhorando a qualidade de vida dos pacientes, sendo mais uma possível via pela qual essa vitamina exerce seu efeito imunomodulatório.

## 7. Conclusões

Os resultados demonstraram, portanto, que níveis basais na expressão de TLR4 e TLR2 não parecem diferir entre pacientes e indivíduos saudáveis, no entanto, frente à vitamina D, a expressão de TLR2 é reduzida. Um efeito inibitório da vitamina D sobre a expressão de ambos os receptores, TLR2 e TLR4, foi observado após ativação das células pelos respectivos agonistas.

Embora não se tenha observado efeito modulador da vitamina D sobre as frequências das subpopulações de monócitos, a expressão de CD116 entre as células CD14<sup>high</sup> parece ser reduzida pela exposição à vitamina D.

Dessa forma, os dados em conjunto apontam um efeito anti-inflamatório da vitamina D associado à diminuição da expressão de receptores envolvidos tanto com a ativação destas células quanto com a migração delas para o SNC, o que pode vir a acarretar a redução das lesões e, assim, a melhora clínica dos pacientes.

## Referências

ALBERTO, C. et al. MÚLTIPLA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO Solange Camargo Médica do Hospital da Lagoa Apesar do crescente interesse sobre a prevalência de esclerose múltipla ( EM ) no Brasil , poucos estudos têm investigado essa população . Um dos principais motivos reside no. v. 7, n. 3, p. 103–111, 2013.

AMITAL, H. et al. Serum concentrations of 25-OH vitamin D in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) are inversely related to disease activity: is it time to routinely supplement patients with SLE with vitamin D? **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 1155–1157, 1 jun. 2010.

ANDERSON, A. C. et al. High Frequency of Autoreactive Myelin Proteolipid Protein–Specific T Cells in the Periphery of Naive Mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 5, 2000.

ANDERSSON, A. et al. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 5, p. 1248–55, nov. 2008a.

ANDERSSON, A. et al. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 5, p. 1248–55, 1 nov. 2008b.

ANDERSSON, B. U. et al. High Mobility Group 1 Protein ( HMG-1 ) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. **The journal of experimental medicine**, v. 192, n. 4, 2000.

ARNON, R.; AHARONI, R. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101 Suppl 2, n. suppl 2, p. 14593–8, 5 out. 2004.

BALNER, H. Identification of peritoneal macrophages in mouse radiation chimeras. **Transplantation**, v. 1, p. 217–23, abr. 1963.

BAR-OR, A. et al. Teriflunomide and Its Mechanism of Action in Multiple Sclerosis.

**Drugs**, v. 74, n. 6, p. 659–674, 17 abr. 2014.

BAR-OR, A. et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis. **Brain**, v. 126, n. 12, 2003.

BECK, J. et al. Increased production of interferon gamma and tumor necrosis factor precedes clinical manifestation in multiple sclerosis: Do cytokines trigger off exacerbations? **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 78, n. 4, p. 318–323, out. 1988.

BEN-NUN, A.; WEKERLE, H.; COHEN, I. R. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. **European Journal of Immunology**, v. 11, n. 3, p. 195–199, 1981.

BENNETT, J. M. The hemopoietic colony-stimulating factors: From biology to clinical applications. **Leukemia Research**, v. 20, n. 8, p. 701, 1 ago. 1996.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes & development**, v. 23, n. 7, p. 781–3, 1 abr. 2009.

BERNARD, C. C. A. et al. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. **Journal of Molecular Medicine**, v. 75, n. 2, p. 77–88, 18 fev. 1997.

BLUNT, J. W.; DELUCA, H. F.; SCHNOES, H. K. 25-Hydroxycholecalciferol. A biologically active metabolite of vitamin D3. **Biochemistry**, v. 7, n. 10, p. 3317–3322, out. 1968.

BOONEN, S. et al. Need for Additional Calcium to Reduce the Risk of Hip Fracture with Vitamin D Supplementation: Evidence from a Comparative Metaanalysis of Randomized Controlled Trials. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 4, p. 1415–1423, abr. 2007.

BRINKMANN, V. The Immune Modulator FTY720 Targets Sphingosine 1-Phosphate Receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 21453–21457, 7 jun. 2002.

BROWN, J. et al. TLR-signaling Networks. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4,

p. 417–427, 12 abr. 2011.

BRÜCK, W. et al. Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. **Annals of Neurology**, v. 38, n. 5, p. 788–796, nov. 1995.

BRUNO, R. et al. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. **European Journal of Immunology**, v. 32, n. 10, p. 2737–2747, out. 2002.

BURGESS, A.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. **Blood**, v. 56, n. 6, 1980.

BURNS, J. et al. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. **Cellular Immunology**, v. 81, n. 2, p. 435–440, 1983.

BURRELL, A. M. et al. Epigenetic Mechanisms in Multiple Sclerosis and the Major Histocompatibility Complex (MHC). **Discovery Medicine**, v. 58, n. 11, p. 187–196, 2011.

CALABRESE, M. et al. A three-year MRI study of cortical lesions in relapse-onset multiple sclerosis. **Annals of Neurology**, v. 67, n. 3, p. NA-NA, 1 mar. 2009.

CALABRESE, M. et al. The changing clinical course of multiple sclerosis: A matter of gray matter. **Annals of Neurology**, v. 74, n. 1, p. 76–83, 1 jul. 2013.

CALABRESI, P. A. et al. Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. **The Lancet Neurology**, v. 13, n. 7, p. 657–665, jul. 2014.

CANTORNA, M. T.; HAYES, C. E.; DELUCA, H. F. -Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. **Immunology**, v. 93, n. 1, p. 7861–786425, 1996.

CEPOK, S. et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. **Brain**, v. 128, n. 7, p. 1667–1676, 2005.

CHOFFLON, M. et al. Tumor necrosis factor alpha production as a possible predictor of relapse in patients with multiple sclerosis. **European cytokine network**,

v. 3, n. 6, p. 523–31, 1991.

CHULUUNDORJ, D. et al. Expansion and preferential activation of the CD14+CD16+ monocyte subset during multiple sclerosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 6, p. 509–517, 18 jul. 2014.

CLIFFORD, D. B. et al. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 4, p. 438–446, 2010.

CODARRI, L. et al. ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 560–567, 24 jun. 2011.

COHEN, B. A.; RIVERA, V. M. PRISMS: the story of a pivotal clinical trial series in multiple sclerosis. <http://dx.doi.org/10.1185/03007991003604018>, 2010.

CORNISH, A. L. et al. G-CSF and GM-CSF as therapeutic targets in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 10, p. 554–559, 1 out. 2009.

CORREALE, J.; YSRRAELIT, M. C.; GAITAN, M. I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1146–1160, 1 maio 2009.

CORREALE, J.; YSRRAELIT, M. C.; GAITÁN, M. I. Vitamin D-mediated immune regulation in Multiple Sclerosis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 311, n. 1–2, p. 23–31, 2011.

CRAVENS, P. D. et al. Lymph node-derived donor encephalitogenic CD4+ T cells in C57BL/6 mice adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis highly express GM-CSF and T-bet. **Journal of Neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 73, 24 jun. 2011.

CURTIN, J. F. et al. HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression. **PLoS Medicine**, v. 6, n. 1, p. e1000010, 13 jan. 2009.

DA COSTA, D. S. M. M. et al. Vitamin D modulates different IL-17-secreting T cell subsets in multiple sclerosis patients. **Journal of Neuroimmunology**, v. 299, p. 8–18, out. 2016.



DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DEVARAJ, S. et al. Increased Toll-Like Receptor (TLR) 2 and TLR4 Expression in Monocytes from Patients with Type 1 Diabetes: Further Evidence of a Proinflammatory State. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 93, n. 2, p. 578–583, 1 fev. 2008.

DEVONSHIRE, V. et al. Relapse and disability outcomes in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod: subgroup analyses of the double-blind, randomised, placebo-controlled FREEDOMS study. **The Lancet Neurology**, v. 11, n. 5, p. 420–428, maio 2012.

DO, J. E. et al. Effects of vitamin D on expression of Toll-like receptors of monocytes from patients with Behcet's disease. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47, n. 6, p. 840–848, 2008.

DU, T. et al. Modulation of monocyte hyperresponsiveness to TLR ligands by 1,25-dihydroxy-vitamin D3 from LADA and T2DM. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 83, n. 2, p. 208–214, 2009a.

DU, T. et al. Regulation by 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 on altered TLRs expression and response to ligands of monocyte from autoimmune diabetes. **Clinica Chimica Acta**, v. 402, n. 1–2, p. 133–138, abr. 2009b.

EBERS, G. C. et al. A Population-Based Study of Multiple Sclerosis in Twins. **New England Journal of Medicine**, v. 315, n. 26, p. 1638–1642, 25 dez. 1986.

EL-BEHI, M. et al. The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. **Nature Immunology**, v. 12, n. 6, p. 568–575, 24 jun. 2011.

FISCHER-SMITH, SIDNEY CROUL, ANDRIJ, T. CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection. **Journal of Neurovirology**, v. 7, n. 6, p. 528–541, jan. 2001.

FISCHER, J. S. et al. Multiple Sclerosis The Multiple Sclerosis Functional Composite measure ( MSFC ): an. **Sage Publications**, 1999.

FISCHER, M. T. et al. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. **Brain**, v. 136, n. 6, p. 1799–1815, 1 jun. 2013.

FLEETWOOD, A. J. et al. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Macrophage CSF-Dependent Macrophage Phenotypes Display Differences in Cytokine Profiles and Transcription Factor Activities: Implications for CSF Blockade in Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, 2007.

FRASER, D. R.; KODICEK, E. Unique Biosynthesis by Kidney of a Biologically Active Vitamin D Metabolite. **Nature**, v. 228, n. 5273, p. 764–766, 21 nov. 1970.

FRISCHER, J. M. et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1175–1189, 1 maio 2009.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. v. 19, p. 71–82, 2003.

GOLD, R.; WOLINSKY, J. S. Pathophysiology of multiple sclerosis and the place of teriflunomide. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 124, n. 2, p. 75–84, 1 ago. 2011.

GOLDSTEIN, J. I. et al. Defective Leukocyte GM-CSF Receptor (CD116) Expression and Function in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 208–216, 2011.

GROUP, T. I. M. S. S. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 43, n. 4, p. 655–655, 1 abr. 1993.

GRUBCZAK, K. et al. Vitamin D 3 Treatment Decreases Frequencies of CD16-Positive and TNF- $\alpha$ -Secreting Monocytes in Asthmatic Patients. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 166, p. 170–176, 2015.

GRZESIUK, A. K. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá - Mato Grosso. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 3a, p. 635–638, set. 2006.

HAIDER, L. et al. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. **Brain**, v. 139, n. 3, p. 807–815, 1 mar. 2016.

HAMILTON, J. A.; ANDERSON, G. P. Mini Review GM-CSF Biology. **Growth Factors**, v. 22, n. 4, p. 225–231, 7 dez. 2004.

HARTUNG, H.-P.; AKTAS, O.; BOYKO, A. N. Alemtuzumab: A new therapy for active relapsing–remitting multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 21, n. 1, p. 22–34, 24 jan. 2015.

HOFMAN, F. M. et al. Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. **Journal of Experimental Medicine**, v. 170, n. 2, 1989.

HOLICK, M. et al. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. **Science**, v. 210, n. 4466, 1980.

HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 3, p. 266–281, 19 jul. 2007.

HOLLAMS, E. M. et al. Vitamin D over the first decade and susceptibility to childhood allergy and asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 139, n. 2, p. 472–481.e9, fev. 2017.

HORTON, R. et al. Variation analysis and gene annotation of eight MHC haplotypes: The MHC Haplotype Project. **Immunogenetics**, v. 60, n. 1, p. 1–18, 10 jan. 2008.

JOSHI, S. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 17, p. 3653–69, 1 set. 2011.

JUNKER, A. et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. **Brain**, v. 132, n. 12, p. 3342–3352, 1 dez. 2009.

KAPPOS, L. et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. **The new england journal of medicine**, v. 362, n. 5, p. 2487–2498, 2010.

KARLIC, H.; VARGA, F. Impact of vitamin D metabolism on clinical epigenetics. **Clinical Epigenetics**, v. 2, n. 1, p. 55–61, 8 abr. 2011.

KAWAKAMI, N. et al. Live imaging of effector cell trafficking and autoantigen recognition within the unfolding autoimmune encephalomyelitis lesion. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 11, p. 1805–14, 6 jun. 2005.

KAWAKAMI, N. et al. An autoimmunity odyssey: how autoreactive T cells infiltrate into the CNS. **Immunological Reviews**, v. 248, n. 1, p. 140–155, jul. 2012.

KEBIR, H. et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1173–1175, 9 nov. 2007.

KELLER, A. et al. Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing- Remitting Disease from Healthy Controls. 2009.

KIESEIER, B. C. et al. Peginterferon beta-1a in multiple sclerosis: 2-year results from ADVANCE. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 21, n. 8, p. 1025–1035, 28 jul. 2015.

KIRCHNER, M. et al. Surface expression and genotypes of Toll-like receptors 2 and 4 in patients with juvenile idiopathic arthritis and systemic lupus erythematosus. **Pediatric Rheumatology**, v. 11, n. 1, p. 9, 2013.

KOCH-HENRIKSEN, N.; SØRENSEN, P. S. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 5, p. 520–532, 2010.

KÖRNER, H. et al. Tumor necrosis factor blockade in actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis prevents clinical disease despite activated T cell infiltration to the central nervous system. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 8, p. 1973–1981, ago. 1997.

KOWALSKI, M. L. et al. Increased responsiveness to toll-like receptor 4 stimulation in peripheral blood mononuclear cells from patients with recent onset rheumatoid arthritis. **Mediators of inflammation**, v. 2008, p. 132732, 23 jun. 2008.

KURTZKE, J. F. et al. Studies on Natural History of Multiple Sclerosis. **Acta**

**Neurologica Scandinavica**, v. 44, n. 4, p. 467–494, 1968.

KURTZKE, J. F.; KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis : An expanded disability status scale ( EDSS ). **Neurology**, 1983.

LAGUMERSINDEZ-DENIS, N. et al. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. **Acta Neuropathologica**, v. 134, n. 1, p. 15–34, 2017.

LASSMANN, H.; BRÜCK, W.; LUCCHINETTI, C. F. The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview. **SYMPOSIUM: New Disease Mechanisms in Multiple Sclerosis**, 2007.

LI, H. et al. Two-tier transcriptional control of oligodendrocyte differentiation This review comes from a themed issue on Neuronal and glial cell biology Edited. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 19, p. 479–485, 2009.

LI, R. et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. **Science translational medicine**, v. 7, n. 310, p. 310ra166, 2015.

LI, T. et al. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF- $\kappa$ B pathway by regulating expression of the kinase IKK $\alpha$  during macrophage differentiation. **Nature Immunology**, v. 11, n. 9, p. 799–805, 15 set. 2010.

LIU, P. T. et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. **Science**, v. 311, n. 5768, 2006.

LOREFICE, L. et al. Monoclonal antibodies: a target therapy for multiple sclerosis. **Inflammation & allergy drug targets**, v. 13, n. 2, p. 134–143, 2014.

LUCCHINETTI, C. et al. Heterogeneity of Multiple Sclerosis Lesions: Implications for the Pathogenesis of Demyelination. **Annals of Neurology**, v. 47, n. 6, p. 707–717, 2000.

LUND, J.; DELUCA, H. F. Biologically active metabolite of vitamin D3 from bone, liver, and blood serum. **Journal of lipid research**, v. 7, n. 6, p. 739–44, 1 nov. 1966.

LYSENG-WILLIAMSON, K. A.; HOY, S. M. Peginterferon beta-1a in relapsing–remitting multiple sclerosis: a guide to its use in the EU. **Drugs & Therapy Perspectives**, v. 31, n. 6, p. 190–195, 9 jun. 2015.

MACHADO, S. **Esclerose Múltipla**. [s.l: s.n.].

MAGLIOZZI, R. et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. **Brain**, v. 130, n. 4, p. 1089–1104, 2007.

MALHOTRA, S. et al. Role of high mobility group box protein 1 (HMGB1) in peripheral blood from patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2015.

MARQUES, C. D. L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 1, p. 67–80, fev. 2010.

MARTA, M. Toll-like Receptors in Multiple Sclerosis Mouse Experimental Models. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1173, n. 1, p. 458–462, set. 2009.

MATLOUBIAN, M. et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. **Nature**, v. 427, n. 6972, p. 355–60, 2004.

MCGUIRE, V. A. et al. Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31159, 8 nov. 2016.

MIRANDA-HERNANDEZ, S.; BAXTER, A. Role of toll-like receptors in multiple sclerosis. 2013.

MIRANDOLA, S. R. et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 7, p. 824–830, 2009.

MORA, J. R.; IWATA, M.; VON ANDRIAN, U. H. Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 685–698, 1 set. 2008.

MORRIS-DOWNES, M. M. et al. Encephalitogenic and immunogenic potential of myelin-associated glycoprotein (MAG), oligodendrocyte-specific glycoprotein (OSP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in ABH and SJL mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 122, n. 1, p. 20–33, 2002.

MÜNZ, C.; STEINMAN, R. M.; FUJII, S. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, 2005.

MURPHY, Á. C. et al. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 4, p. 641–651, maio 2010.

NAITO, S. et al. Multiple Sclerosis: Association with HL-A3. **Tissue Antigens**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 9 out. 1972.

NEUHAUS, O. et al. Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 56, n. 6, p. 702–708, 27 mar. 2001.

NOVAKOVIC, B. et al. Placenta-specific methylation of the vitamin D 24-hydroxylase gene: implications for feedback autoregulation of active vitamin D levels at the fetomaternal interface. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 22, p. 14838–48, 29 maio 2009.

O'GORMAN, C. et al. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. **Neuroepidemiology**, v. 40, n. 1, p. 1–12, 2013.

OKADA, H.; KHOURY, S. J. Type17 T-cells in Central Nervous System Autoimmunity and Tumors. **Journal of Clinical Immunology**, v. 32, n. 4, p. 802–808, 28 ago. 2012.

OLSON, J. K.; MILLER, S. D. Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 6, 2004.

ONTANEDA, D.; RAE-GRANT, A. D. Management of acute exacerbations in multiple sclerosis. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 12, n. 4, p. 264–72, out. 2009.

OTA, K. et al. T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. **Nature**, v. 346, n. 6280, p. 183–7, 12 jul. 1990.

PANEK, R. B.; BENVENISTE, E. N. Class II MHC gene expression in microglia. Regulation by the cytokines IFN-gamma, TNF-alpha, and TGF-beta. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 6, 1995.

PARK, J. S. et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 9, p. 7370–7, 27 fev. 2004.

PARK, J. S. et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 290, n. 3, 2006.

PATEL, S. et al. Association between serum vitamin D metabolite levels and disease activity in patients with early inflammatory polyarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 56, n. 7, p. 2143–2149, 1 jul. 2007.

PATSOPOULOS, N. A. et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 11, p. e1003926, 21 nov. 2013.

PEDRE, X. et al. Changed Histone Acetylation Patterns in Normal-Appearing White Matter and Early Multiple Sclerosis Lesions. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 9, 2011.

PIERRE, R. V. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. **Clinics in laboratory medicine**, v. 22, n. 1, p. 279–97, 1 mar. 2002.

PIMENTA, A. L. PORTARIA Nº 1.505, DE 29 DE DEZEMBRO DE 2014(\*). v. 2014, 2015.

POLMAN, C. H. et al. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 9, p. 899–910, 2 mar. 2006.

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, 1 fev. 2011.



PONCHON, G.; KENNAN, A. L.; DELUCA, H. F. Activation of vitamin D by the liver. **The Journal of clinical investigation**, v. 48, n. 11, p. 2032–7, nov. 1969.

POSER, C. M. Multiple sclerosis trait: the premorbid stage of multiple sclerosis. A hypothesis. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 109, n. 4, p. 239–243, 1 abr. 2004.

PRINZ, M. et al. Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 2, p. 456–64, fev. 2006.

PROVVEDINI, D. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. **Science**, v. 221, n. 4616, 1983.

RICHERT, J. R. et al. Expansion of antigen-specific T cells from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 5, n. 3, p. 317–324, 1983.

ROBERTSON, N. P. et al. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. **Brain**, v. 119, n. 2, 1996.

ROSATI, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. **Neurological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 117–139, 1 abr. 2001.

RUDICK, R. A. Cytokine Secretion by Multiple Sclerosis Monocytes. **Archives of Neurology**, v. 49, n. 3, p. 265, 1992.

RUNIA, T. F. et al. Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 79, n. 3, p. 261–6, 17 jul. 2012.

SADEGHI, K. et al. Vitamin D3 down-regulates monocyte TLR expression and triggers hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 361–370, 1 fev. 2006.

SCAFFIDI, P.; MISTELI, T.; BIANCHI, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. **Nature**, v. 418, n. 6894, p. 191–195, 11 jul. 2002.

SELMAJ, K. W.; RAINE, C. S. Tumor necrosis factor mediates myelin and

oligodendrocyte damage in vitro. **Annals of Neurology**, v. 23, n. 4, p. 339–346, abr. 1988.

SILVA, F. H. R. et al. Epidemiology of multiple sclerosis in Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 357, p. e22, out. 2015.

SIMPSON, S. et al. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 82, n. 10, p. 1132–41, out. 2011.

STARK, G. R. et al. HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 227–264, jun. 1998.

STEINMAN, L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. **Cell**, v. 85, n. 3, p. 299–302, 3 maio 1996.

STERNBERG, Z. et al. High-mobility group box 1 in multiple sclerosis. **Immunologic Research**, v. 64, n. 2, p. 385–391, 23 abr. 2016.

STORCH, M. K. et al. Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology. **Brain Pathology**, v. 8, n. 4, p. 681–694, out. 1998.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. TOLL-LIKE RECEPTORS. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 335–376, abr. 2003.

TAKEDA, M. et al. Oral Administration of an Active Form of Vitamin D3 (Calcitriol) Decreases Atherosclerosis in Mice by Inducing Regulatory T Cells and Immature Dendritic Cells With Tolerogenic Functions. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 30, n. 12, 2010.

TROTTER, J. L. et al. Peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients recognize myelin proteolipid protein and selected peptides. **Journal of Neuroimmunology**, v. 33, n. 1, p. 55–62, 1991.

TROTTER, J. L. et al. T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. **Journal of Neuroimmunology**, v. 84, n. 2, p. 172–178, 1998.

TSUNG, A. et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. **Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 7, 2005.

URRA, X. et al. Monocyte Subtypes Predict Clinical Course and Prognosis in Human Stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 29, n. 5, p. 994–1002, 18 maio 2009.

VAN FURTH, R. Origin and Turnover of Monocytes and Macrophages. In: [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1989. p. 125–150.

VENCI, J. V.; GANDHI, M. A. Dimethyl Fumarate (Tecfidera): A New Oral Agent for Multiple Sclerosis. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 47, n. 12, p. 1697–1702, 1 dez. 2013.

VOGEL, D. Y. S. et al. GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. p. 1–32, 2015a.

VOGEL, D. Y. S. et al. GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. **European journal of immunology**, v. 45, n. 6, p. 1808–19, jun. 2015b.

VOGEL, D. Y. S. et al. GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 6, p. 1808–1819, 1 jun. 2015c.

WANG, T.-T. et al. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 4, p. 2227–31, 22 jan. 2010.

WASCHBISCH, A. et al. Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 196, n. 4, p. 1558–67, 15 fev. 2016.

WEBER, M. S. et al. Multiple sclerosis: Glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. **Brain**, v. 127, n. 6, p. 1370–1378, 2004.

WEINSHENKER, B. G. et al. THE NATURAL HISTORY OF MULTIPLE SCLEROSIS: A GEOGRAPHICALLY BASED STUDY. **Brain**, v. 112, n. 6, p. 1419–

1428, 1 dez. 1989.

WING, K. et al. CD4 T cell activation by myelin oligodendrocyte glycoprotein is suppressed by adult but not cord blood CD25<sup>+</sup> T cells. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 3, p. 579–587, mar. 2003.

WU, S. et al. Vitamin D Receptor Negatively Regulates Bacterial-Stimulated NF- $\kappa$ B Activity in Intestine. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 2, p. 686–697, 2010.

WUCHERPFENNIG, K. W.; STROMINGER, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. **Cell**, v. 80, n. 5, p. 695–705, 1995.

XIE, Z. et al. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced dendritic cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing proportions of the regulatory lymphocytes and reducing T helper type 1 and type 17 cells. **Immunology**, 10 jul. 2017.

YANG, J. et al. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker research**, v. 2, n. 1, p. 1, 2014.

YU, S.; CANTORNA, M. T. Epigenetic reduction in invariant NKT cells following in utero vitamin D deficiency in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 3, p. 1384–90, 1 fev. 2011.

ZAMVIL, S. S.; STEINMAN, L. The T Lymphocyte in Experimental Allergic Encephalomyelitis. **Annual Review of Immunology**, v. 8, n. 1, p. 579–621, abr. 1990.

ZHANG, J. et al. Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 3, 1994.

ZHANG, Y. et al. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. **Journal of immunology**

(Baltimore, Md. : 1950), v. 188, n. 5, p. 2127–35, 1 mar. 2012.

ZHU, B. et al. CD11b+Ly-6Chi Suppressive Monocytes in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, 2007.

ZHU, Y. et al. Calcium and 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin $_2$ D $_3$  target the TNF- $\alpha$  pathway to suppress experimental inflammatory bowel disease. **European Journal of Immunology**, v. 35, n. 1, p. 217–224, jan. 2005.

ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. L. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. **Immunology Today**, v. 17, n. 9, p. 424–428, set. 1996.

Disponível em <http://paranashop.com.br/2017/02/esclerose-multipla-atinge-cerca-de-30-mil-brasileiros-mas-ainda-e-subdiagnosticada/> acessado em 26 de julho de 2017.

Disponível em <https://www.msif.org/>, acesso em 26 de julho de 2017.

Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset\\_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/aprovado-produto-para-tratamento-de-esclerose-multipla/219201?inheritRedirect=false](http://portal.anvisa.gov.br/rss/-/asset_publisher/Zk4q6UQCj9Pn/content/aprovado-produto-para-tratamento-de-esclerose-multipla/219201?inheritRedirect=false) acessado em 20 de junho de 2017.

## ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**  
**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**  
**Laboratório de Imunidade Inata**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **Título do Projeto:**

**“PERFIL DE CÉLULAS DA IMUNIDADE INATA DE PACIENTES COM ESCLEROSE  
MÚLTIPLA”**

Investigador Principal: Dra. Vera Carolina Bordallo Bittencourt – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: 2531-7906/ 993123537

#### ***EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES***

##### ***Propósito do estudo***

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com Esclerose Múltipla (EM) e compará-los com indivíduos saudáveis.

##### ***1.2- Procedimentos***

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de EM, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias.

Após a entrevista, e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 40 mL de sangue periférico que será utilizado para avaliação de seu sistema imune.

##### ***1.3- Riscos e desconfortos***

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentindo desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. Para coleta do sangue periférico será utilizado material estéril, descartável, sob condições adequadas.

## ***Benefícios***

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à EM. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

### ***1.5-Alternativas para a participação***

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

### ***1.6- Custos e compensações***

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

### ***1.7- Confidenciabilidade***

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

### ***1.8- Direito para se retirar da pesquisa***

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar nessa pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

## ***Perguntas ou problemas***

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dr<sup>a</sup>. Denise Medrado ou Dr<sup>a</sup>. Vera Carolina B. Bittencourt, professora e Imunologista da UNIRIO tel: 2531-7906; 993123537

## ***Consentimento***

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você **VOLUNTARIAMENTE** concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo:

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador:

Assinatura do Investigador:

Testemunha:

Assinatura da Testemunha:

Data:



## ANEXO II

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
GAFFREE E  
GUINLE/HUGG/UNIRIO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** PERFIL IMUNE NA ESCLEROSE MÚLTIPLA

**Pesquisador:** Cleonice Alves de Melo Bento

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 43009015.6.0000.5258

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

**Patrocinador Principal:** FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.044.203

**Data da Relatoria:** 29/04/2015

#### Apresentação do Projeto:

ANÁLISE DO PERFIL FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS DE PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o impacto de diferentes fatores ambientais no perfil funcional das dos linfócitos de pacientes com esclerose múltipla remitente recorrente (EM-RR) e sua relação com o curso da doença e resposta à terapêutica.

Objetivo Secundário:

Avaliar a expressão de diferentes tipos de receptores do tipo toll (TLRs) em células T e B de pacientes com EM-RR; Investigar o papel de diferentes agonistas de TLRs na resposta proliferativa e produção de citocinas em culturas de células T de pacientes com EM à proteína básica da mielina (PBM); Avaliar a habilidade do glicocorticoide em modular a resposta das células T e B de pacientes com EM estimuladas in vitro com PBM, na presença ou na ausência de diferentes agonsitas de TLRs; Avaliar a capacidade da vitamina D em modular o status funcional das células T e B de pacientes com EM-RR seguindo a adição de PBM com ou sem diferentes agonistas de TLRs.

**Endereço:** Rua Mariz e Barros nº 775

**Bairro:** Tijuca

**CEP:** 22.270-004

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)1264-5317

**Fax:** (21)1264-5177

**E-mail:** cephugg@gmail.com

Continuação do Parecer: 1.044.203

Investigar uma possível correlação entre a frequência de diferentes fenótipos das células T e B Ag-específicas estimuladas sob diferentes condições com o grau de incapacidade neurológica dos pacientes com EM-RR e à resposta à terapêutica. Investigar uma possível correlação entre a frequência de diferentes fenótipos das células T e B Ag-específicas estimuladas sob diferentes condições com os níveis de vitamina D no sangue periférico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os possíveis riscos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, como leve desconforto doloroso ou discreta rouidão local.

**Benefícios:**

Pelos resultados dos ensaios que serão realizados, o paciente não será beneficiado diretamente, nem seus descendentes. Contudo, irão nos ajudar a compreender melhor como o sistema imune ataca os neurônios do sistema nervoso central. Ainda irá ajudar a identificar porque alguns pacientes possuem formas mais agressivas da doença com maior progressão e menor resposta a terapêutica disponível. Esse conhecimento possivelmente ajudará no desenvolvimento futuro de novas estratégias de tratamento e controle das crises de incapacidade neurológica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

o projeto tem como desfecho principal: Conseguir demonstrar que elevada expressão de receptores do tipo toll (TLRs) nas células T está atrelada à maior progressão da esclerose múltipla e a menor resposta ao corticoide, droga imunossupressora utilizada para controlar as crises clínicas. Ademais, deficiência de vitamina D no sangue

pode estar atrelada a uma forma mais agressiva da doença.

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

Presentam-se completos.

**Recomendações:**

não há

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

não há.

**Endereço:** Rua Mariz e Barros nº 775

**Bairro:** Tijuca

**CEP:** 22.270-004

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)1264-5317

**Fax:** (21)1264-5177

**E-mail:** cephugg@gmail.com

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
GAFFREE E  
GUINLE/HUGG/UNIRIO



Continuação do Parecer: 1.044.203

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

RIO DE JANEIRO, 30 de Abril de 2015

---

Assinado por:  
Pedro Eder Portari Filho  
(Coordenador)

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775  
Bairro: Tijuca CEP: 22.270-004  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)1264-5317 Fax: (21)1264-5177 E-mail: cephugg@gmail.com

Página 03 de 03