UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DERMATOLOGIA

JAÍNE SOARES LIMA DA SILVA

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA
NA PATOGÊNESE DA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

**SÃO PAULO
2018**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DERMATOLOGIA

JAÍNE SOARES LIMA DA SILVA

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA
NA PATOGÊNESE DA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em ciências.

Programa de Dermatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Alessandra Pontillo

Versão Corrigida

SÃO PAULO
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

Candidato (a): Jaíne Soares da Silva

Título da dissertação: Análise da contribuição do inflamassoma na esclerose múltipla.

Orientador (a): Alessandra Pontillo

A comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes do ambulatório de doenças desmielinizantes da disciplina de Neurologia da UNIFESP-EPM e também dedico aos doadores saudáveis que serviram de base para o decorrer do estudo, que literalmente se doaram para a realização desse trabalho.

“Palavras são, na minha nada humilde opinião, nossa inesgotável fonte de magia. Capazes de formar grandes sofrimentos e também de remediá-los”.

Alvo Dumbledore , Harry Potter e as Relíquias da Morte.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a capacidade psicológica e física para chegar até este momento, confesso que não foi fácil e muitas vezes pensei que não conseguiria prosseguir, mas com ajuda dele aqui estou.

A minha mãe Luiza e a irmã Laíne, que em meio a minha juventude me apoiaram na minha escolha e acreditaram em mim e no meu potencial e até hoje são minhas maiores incentivadoras.

Ao meu irmão Junior, que sempre soube identificar meus momentos de fragilidade e com palavras simples ou mesmo no silêncio de me ouvir, me ajudou. Também agradeço ao meu pai que me incentivou a chegar aqui.

Ao meu esposo Rodrigo, que em conjunto com minha família, é meu porto seguro, consegue através de simples palavras resolver meus maiores problemas e que através de sua tranquilidade e amor acima de tudo me ajudou a concluir esse trabalho.

A minha orientadora Alessandra, que acreditou em mim em muitos momentos que eu descreditei e sempre me auxiliou em tudo.

Aos meus colegas de laboratório que fizeram parte desse momento importante da minha vida, desde do início, seja fazendo um experimento para mim, analisando algo comigo ou simplesmente me ajudando a compreender as dificuldades e inseguranças reais da vida acadêmica, Edione, Fernanda, Vinicius, Dhermerson, Mariana, Iohanã, Elaine, Pamela, muito obrigada.

Ao meu filho amado e querido, Dobby Potter Lima, que chegou para alegrar minha vida e com seus lambeijinhos, meu amor de 4 patas.

A Minha sogra Dilene, pelo apoio. Minhas cunhadas Joyce e Marcelle, minha sobrinha Júlia e meu sogro Marcelo pelos momentos de distração e apoio.

Aos membros da minha banca de qualificação, que através da sua avaliação e sugestões ajudaram a compor os elementos que faltavam ou ressaltar os que tinham neste trabalho, muito obrigada Prof^a Maria Sato, Prof^o Trácio Braga e Prof^o Jean Pierre.

As agências de fomento CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

SOARES, Jaíne Lima da Silva. **Análise da contribuição do inflamassoma na esclerose múltipla**. 2018.(N° folhas). Dissertação (Mestrado em Dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A esclerose múltipla (EM), doença neurodegenerativa do sistema nervoso central (SNC) com característica auto-imune e inflamatória, com eventos iniciais, bem como a evolução da EM. É uma doença heterogênea (três principais formas clínicas) e multifatoriais. A imunidade inata demonstrou recentemente ser um fator importante na EM e as variantes genéticas dos componentes do inflamassoma têm sido associadas a doenças autoimunes e neurodegenerativas, com isso hipotetizamos que o inflamassoma e suas citocinas IL-1 β e IL-18, podem representar importantes contribuintes na patogênese da EM e eventualmente explicar, pelo menos em parte, a heterogeneidade observada em pacientes com EM. Fizemos uma análise multivariada que foi realizada com base na forma clínica (recorrente remitente/RR, primária progressiva /PP ou secundária progressiva /SP, índice de gravidade (EDSS) e índice de progressão (IP). Os monócitos do sangue periférico (PBMC) dos pacientes foram examinados para ativação do inflamassoma (Produção de IL-1 β e IL-18, clivagem de caspase-1). Com os objetivos de avaliar a contribuição do inflamassoma na EM, em termos de (a) efeito genético sobre o desenvolvimento, gravidade e / ou prognóstico, e (b) ativação complexa de células de sangue periférico como uma forma de avaliar a inflamação sistêmica. Para isso, utilizamos variantes genéticas funcionais em componentes do inflamassoma, que foram analisadas em uma coorte de pacientes com EM, pelo uso de ensaios específicos de alelos e qPCR. A análise multivariada resultou em associação com a variante -511C / T IL1B ganho de função, sendo essa mais frequente em formas progressivas (especialmente SP) do que em RR. A variante de ganho de função NLRP3 Q705K resultou mais frequente em pacientes com EDSS > 3 do que em pacientes com EDSS <3 e, conseqüentemente, esse SNP está associado a um IP mais elevado. A análise de PBMC mostrou que as células de indivíduos EM, são mais propensas a responder a um estímulo NLRP3 clássico (isto é, LPS) do que as dos doadores saudáveis. Em conjunto, esses achados indicaram que os pacientes com EM apresentam uma desregulação no inflamassoma NLRP3, podendo ser avaliada no sangue periférico facilitando um prognóstico, e que esse perfil pode ser secundário a um mecanismo genético pró-inflamassoma.

Palavras-chave: esclerose múltipla (EM). Inflamassoma. NLRP3. Escala expandida do estado de incapacidade (EDSS). Polimorfismos. Células mononucleares de sangue periférico (PBMC).

ABSTRACT

SOARES, J.L.S. Analysis of the contribution of inflammasome in multiple sclerosis. 2018.(N° folhas). Dissertação (Mestrado em Dermatologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The multiple sclerosis (MS), neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS) with autoimmune and inflammatory characteristics, with initial events, as well as the evolution of MS, are heterogeneous (three main clinical forms) and multifactorial. Innate immunity has recently been shown to be an important factor in MS and the genetic variants of the components of inflammasoma have been associated with autoimmune and neurodegenerative diseases, thereby hypothesizing that the inflammasoma and its IL-1 β and IL-18 cytokines may represent important contributors in the pathogenesis of MS and possibly explain, at least in part, the heterogeneity observed in MS patients. We performed a multivariate analysis that was performed based on clinical form (recurrent recurrent / RR, progressive primary / PP or progressive secondary / SP, EDSS and progression index.) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of patients were examined for inflammatory activation (IL-1 β and IL-18 production, caspase-1 cleavage). With the objectives of evaluating the contribution of inflammasoma in MS in terms of (a) genetic effect on development, severity and / or prognosis, and (b) complex activation of peripheral blood cells as a way of assessing systemic inflammation. For this, we used functional genetic variants in components of the inflammasoma, which were analyzed in a cohort of MS patients, through the use of specific allele and qPCR assays. For this, we used functional genetic variants in components of the inflammasoma, which were analyzed in a cohort of MS patients, through the use of specific allele and qPCR assays. Multivariate analysis resulted in association with the -511C / T IL1B function gain, which is more frequent in progressive forms (especially SP) than in RR. The gain variant of NLRP3 Q705K function was more frequent in patients with EDSS > 3 than in patients with EDSS < 3 and, consequently, this SNP is associated with a higher PI. PBMC analysis showed that cells from MS individuals are more likely to respond to a classical NLRP3 (ie LPS) stimulus than healthy donors. Taken together, these findings indicated that patients with MS have a dysregulation in the NLRP3 inflammasoma and can be evaluated in the peripheral blood facilitating a prognosis and that this profile may be secondary to a pro-inflammatory genetic mechanism.

Key words: multiple sclerosis (MS). Inflammasome. NLRP3. Expanded Disability Status Scale (EDSS). Polymorphisms. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDSS: Expanded Disability Status Scale

EM: Esclerose Múltipla

IL1B: Interleucina 1 beta

IL18: Interleucina 18

IP: Índice de progressão

SNC: Sistema nervoso central

PP: Primária progressiva

SP: Secundária Progressiva

RR: Remitente recorrente

EAE: Encefalomielite autoimune experimental

SNP: Single nucleotide polymorphism

NLRP1: NLR family pyrin domain containing 1

NLRP3: NLR family pyrin domain containing 3

NLRC4: NLR family CARD domain-containing protein 4

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

EBV: Epstein-Barr vírus

NMO: Neuromielite óptica

NO: Neurite ótica

CRION: Chronic relapsing inflammatory optic neuropathy

CIS: Clinically Isolated Syndrome

ADEM: Acute Disseminated Encephalomyelitis

IFN- β : Beta-Interferon

T CD4+: Linfócito T auxiliar

Th1: Linfócito T helper 1

Th17: Linfócito T helper 17

T CD8+: Linfócito T citotóxico

BHE: Barreira hemato encefálica

TLRs: Toll Like Receptors

NLRs: Nod like receptors

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

MHC: Major Histocompatibility Complex

HLA: human leukocyte antigen

GWAS: Genome-wide association study

IL7RA: Interleucina 7 receptor subunidade alfa
IL2RA: Interleucina 2 receptor subunidade alfa
TNFR1: Tumor necrosis factor receptor 1
TNF: Tumor necrosis factor
SI: Sistema Imune
PLXNA3: Plexin A3
AHL1: Abelson helper integration site 1
HSP-70: Heat shock protein 70
PD-1: Programmed cell death protein 1
ITGA4: Integrin subunit alpha 4
SPP1: Secreted phosphoprotein 1
PAMPs: Padrões moleculares associados a patógenos
DAMPs: Padrões moleculares associados a dano
LRR: Leucine-rich repeat
PYD: Pyrin domain
ASC: Apoptosis-associated Speck-like Protein
NF-κB: Factor nuclear kappa B
IRFs: Interferon regulatory factors
RNA: Ácido ribonucleico
CARD8: Caspase recruitment domain family member 8
AIM2: Absent in melanoma 2
CASP1: Caspase 1
PRRs: Receptor de reconhecimento de padrões
IL1R: Receptor de interleucina-1
DNA: Ácido desoxirribonucleico
ATP: Adenosina trifosfato
IL-12: Interleucina 12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Esclerose múltipla	12
1.2. Genética da EM	16
1.3 Inflamassoma e Esclerose Múltipla	17
2. HIPÓTESE DE TRABALHO	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Casuística de esclerose múltipla	23
4.1.2. Casuística para estudo celular <i>in vitro</i>	25
4.2. Grupos controles	26
4.2.1 Grupo controle para o estudo de genotipagem	26
4.2.2 Grupo controle para estudo <i>in vitro</i>	27
4.3. Seleção de polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma e genotipagem	27
4.4. Análise da distribuição dos SNPs	28
4.5. Obtenção de monócitos do sangue periférico	29
4.6. Ensaio de ativação do inflamassoma nos monócitos isolados de pacientes com EM	29
4.7. Avaliação da concentração de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultura	30
4.8. Extração de RNA, retrotranscrição e análise da expressão gênica relativa	30
4.9 Análise <i>in silico</i> da expressão gênica do inflamassoma no SNC	31
5. RESULTADOS	32
5.1 PARTE I – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO	32
5.1.1 Análise dos SNPs selecionados para o estudo	32
5.1.2 Distribuição de polimorfismos de base única selecionados em genes do inflamassoma na corte caso/controle de esclerose múltipla	34
5.1.3 Avaliação da contribuição dos SNPs selecionados na gravidade da EM	37
5.1.4 Avaliação da contribuição de variantes do inflamassoma na forma clínica da EM	40
5.1.5 Contribuição da genética do inflamassoma na resposta ao tratamento para EM	42
5.1.6 A genética do inflamassoma no diagnóstico diferencial da EM com outras doenças neurológicas	44

5.2 PARTE II – Análise funcional do inflamassoma em pacientes com EM.....	46
5.2.1 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes EM.....	46
5.2.2 Análise do perfil de expressão genica do inflamassoma em monócitos de pacientes EM.....	49
5.2.3. Análise <i>in silico</i> da expressão do inflamassoma no SNC de pacientes EM.....	50
6. DISCUSSÃO.....	51
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8.ANEXOS.....	60

1. INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa autoimune e inflamatória que afeta cerca de 2 milhões de indivíduos no mundo, prevalentemente jovens (início entre a terceira e a quarta década de vida) e mulheres (mulheres/homens: 2/1) e (HARBO, 2013; SRIRAMOJU, 2015). É considerada a mais comum causa de incapacidade neurológica não traumática em jovens adultos.

O primeiro relato clínico da EM foi feito em meados do século XIV, em uma jovem mulher que apresentou uma gradual perda da deambulação e da visão. Ela apresentava episódios de falta de coordenação muscular associados à dor de cabeça e comprometimento visual, cada vez mais frequente (MEDAER, 1979; POSER, 1994). Em 1822 encontraram os diários do jovem Augustus d’Este, que relatou sintomas como: perda da deambulação, fadiga, comprometimento da visão, e a princípio acreditou-se ser sintomas isolados e sem correlação, porém com o passar dos anos notou-se uma evolução clínica do seu quadro, relatando os diversos sintomas, ao longo de 20 anos, de uma doença que se assemelha em muito ao que hoje se conhece por EM (LANDTBLOM, 2010). Porém, a definição foi feita apenas em 1868, pelo médico neurologista francês, Jean Martin Charcot, que através da análise de autopsias dos pacientes com um tipo semelhante de apresentação clínica, fez uma relação com os dados clínicos desses mesmos indivíduos em vida, e percebeu que os cérebros desses pacientes tinham a presença de lesões fibróticas, e que esses achados poderiam estar relacionados com a apresentação clínica *ante-mortem*. Chacort chamou a doença desconhecida de “*la sclérose en plaques*” (esclerose em placas), e foi também o primeiro médico a diagnosticar a EM num paciente vivo. (THORBURN, 1967; TAN e SHIGAKI, 2007; KUMAR, 2011).

As causas da EM permanecem obscuras, a sua patogênese parece ser multifatorial, ou seja, o resultado da combinação de diversos fatores, entre eles genéticos, ambientais (ex: exposição solar, nutrição, fumo) e infecciosos (ex: EBV). Esses fatores resultariam na perda de homeostase imunológica e de tolerância ao “próprio” (“self”), levando a infiltração no SNC (cérebro e medula espinhal) de células mononucleadas ativadas e assim gerando o desenvolvimento de um processo inflamatório patológico contra mielina e componentes do SNC. A perda de mielina e as consequentes lesões axônais geram uma disfunção neurológica que resulta em distúrbios de comunicação entre o cérebro e o corpo, e com o tempo levam a perda da massa encefálica (DISANTO, 2012; O’GORMAN, 2012).

Os sintomas são muito variáveis, e inespecíficos, porque depende da quantidade de lesões e de onde estas lesões estão localizadas. Os pacientes com formas clínicas de EM mais agressivas apresentam dificuldades locomotoras, problemas de visão como diplopia, nistagmo que são oscilações repetidas e involuntárias ou amaurose que é cegueira total ou parcial, ou de falar claramente, até problemas cognitivos e psicológicos devido a diminuição da massa encefálica (PEPPING e EHDE, 2005; KISTER, 2013).

Nos estágios iniciais, a doença pode ser difícil diagnosticar, uma vez que os sintomas são pouco específicos para se associar a uma doença neurodegenerativa, entre eles: perda de sensibilidade tátil ou formigamento, fadiga muscular, espasmos musculares, dificuldades de coordenação motora e equilíbrio, visuais, e deglutição, aparecem com esporadicamente e com intervalos, dessa forma os pacientes podem ficar meses ou anos sem qualquer sinal da doença, que pode ser considerado uma remissão dos sintomas (MATTHEWS, 1975; PUJOL, 1997; KISTER, 2013).

O diagnóstico da EM é geralmente clínico baseado na a presença de sintomas e sinais sugestivos da doença no cérebro ou na medula espinal, recorrência de episódios com sintomas (anamnese clínica), em conjunto com exames médicos de suporte (ex.: ressonância magnética e/ou análise de líquido) (PIRTTILA e NURMIKKO, 1995; GELFAND, 2014). Frequentemente é um diagnóstico por exclusão. Outras doenças neurológicas possuem sintomas semelhantes e podem entrar em diagnóstico diferencial com EM tais como, a neuromielite óptica (NMO), neurite ótica (NO), doença neuropática ótica inflamatória recorrente crônica (CRION), síndrome clinicamente isolada (CIS), mielopatia e encefalomielite disseminada aguda (ADEM), (ZHANG, 2014; PUTHENPARAMPIL, 2017).

A avaliação dos pacientes com EM é baseada no comprometimento neurológico, medido através de diversos índices, porém iremos destacar o mais conhecido e utilizado, a Escala Expandida do Estado de Incapacidade do inglês (Expanded Disability Status Scale) – EDSS, (KURTZKE, 1983).

Em toda sua complexidade a EM, possui três diferentes apresentações clínicas, e cada uma delas tem um quadro clínico e evolução diferente, isso se dá pela heterogeneidade clínica, na maioria dos pacientes, os sintomas também chamados de surtos, definidos como sintomas neurológicos novos ou crescentes, seguidos por períodos de recuperação parcial ou total (remissão) e ausência sintomas (forma remitente-recorrente, RR). Uma parte dos pacientes com forma RR ao longo dos anos evolui com piora gradual, com intervalos em menor espaço de tempo e sem recuperação total dos sintomas, levando a progressão (forma progressiva secundária, SP). Mais raramente alguns indivíduos apresentam uma forma de EM que é

progressiva desde o primeiro sintoma, sem remissão e com rápida progressão (forma progressiva primária, PP). (MCDONALD, 2001; COMPSTON e COLES, 2008; REJDAK, 2010; DUTTA e TRAPP, 2014; LUBLIN, 2014).

A EM não tem cura, mas medicações disponíveis podem ajudar a controlar a doença. Os tratamentos disponíveis visam o controle dos surtos e dos sintomas, e reduzir a progressão da doença. Os medicamentos usados para o tratamento da EM são em geral imunomoduladores que tem como mecanismo de ação a inibição de leucócitos infiltrantes no SNC ou na sua ativação (ex.: IFN- β), (DHIB-JALBUT e MARKS, 2010).

Esse quadro clínico, é uma consequência da desmielinização nos axônios dos neurônios, e da morte de oligodendrócitos, que são células do sistema nervoso central que fazem a manutenção da bainha de mielina. A desmielinização é um evento agressivo causado pela infiltração de células imunes ativadas e autoreativas, que induzem inflamação devido a resposta imune tanto inata quanto adaptativa, culminando na instalação da doença (ZINDLER e ZIPP, 2010; YONG, 2017).

O que se sabe atualmente dos mecanismos imunológicos envolvidos na EM, se dá através do modelo experimental de encefalomielite autoimune experimental (EAE; do inglês *experimental autoimmune encephalomyelitis*) feito em geral em camundongos, e que apresenta muitas características da doença com: inflamação no SNC, desmielinização, perda axonal e gliose (HEMMER, 2002; HERNANDEZ-PEDRO, 2013). Na EAE as células T CD4+ autoreativas (do perfil Th1 e Th17) ativam uma resposta imune direcionada contra a bainha de mielina, principalmente mediada por linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e macrófagos, infiltrantes que migraram através do sangue periférico, por um aumento de permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) (DENDROU, 2015; PRINZ e PRILLER, 2017). É provável que tanto a inflamação sistêmica, quanto o SNC contribuam, para a ativação dos leucócitos e em sua migração. Porém não é apenas os leucócitos infiltrantes que são responsáveis pelo dano imune contra a mielina, mas também as próprias células do SNC, micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, que contem receptores da imunidade inata (ex.: TLRs, NLRs) e podem contribuir na produção de mediadores inflamatórios (KUERTEN e LEHMANN, 2011; GRIGORIADIS e VAN PESCH, 2015).

Esses dados estão em acordo com a elevada concentração de citocinas inflamatórias no sangue e com os achados inflamatórios no exame ressonância magnética dos pacientes com EM (ELLIDAG, 2013; OTA, 2013). A maioria dos pacientes também apresenta a produção de auto-anticorpos, como demonstrado pelas bandas oligoclonais no líquido cefalorraquidiano (CORREALE e DE LOS MILAGROS BASSANI MOLINAS, 2002; EIKELNBOOM, 2003)

Na figura 1 está resumida a hipótese patogenética da EM.

Figura 1. Hipótese sobre o desencadeamento da Esclerose Múltipla. Pré-disposição genética, perda da tolerância central e periférica; linfócitos autorreativos; migram para o SNC; gatilhos para o desenvolvimento da E; apresentação de antígenos via MHC I e II; autoimunidade; inflamação; desmielinização.

1.2 Genética da EM

A EM é considerada uma doença multifatorial com componente poligênica (OMIM: #126200). Evidências de uma contribuição genética na EM vem tanto de estudos populacionais, onde foi observado que a EM é mais frequente em alguns grupos étnicos, como em indivíduos com ascendência na Europa do norte (ROSATI, 2001), em estudos de famílias observa-se um moderado padrão de herança. Familiares de pacientes com EM possuem maior risco de desenvolver a doença (NIELSEN, 2005; MILO e MILLER, 2014), assim como gêmeos monozigóticos e dizigóticos (30% e 5% de risco aumentado, respectivamente) (EBERS, 1995; COMPSTON e COLES, 2002; WILLER, 2003; LIN, 2012).

A partir dos anos 70, demonstrou-se a associação do locus *MHC* (6p21.32) com a EM, e o importante efeito exercido das variantes nos genes do antígeno humano leucocitário (HLA, do inglês “human leucocitary antigen”) com o risco de desenvolver a doença. (NAITO, 1972;

JERSILD, 1973). Tanto variantes nos genes de classe I (*HLA-A* e *HLA-B*) quanto de classe II (*HLA-DRB1*) foram associadas com EM. O alelo que mostrou uma maior associação foi o *HLA-DRB1*15:01* com um valor médio de OR de cerca 3.08, e com um claro efeito de dose resposta pelas cópias (0, 1, ou 2) carregadas pelo indivíduo. Em descendentes de europeus os alelos HLA de risco (independente) são os *DRB1*15:01*, *DRB1*13:03*, *DRB1*03:01*, *DRB1*08:01*, e *DQB1*03:02*, enquanto que os de proteção (independente) são *A*02:01*, *B*44:02*, *B*38:01*, e *B*55:01*. Foram encontradas também combinações de risco de alelos de classe II: *DQA1*01:01–DRB1*15:01* e *DQB1*03:01–DQB1*03:02*. (PATSOPOULOS, 2013; HOLLENBACH e OKSENBERG, 2015; MOUTSIANAS, 2015; HOLLENBACH, 2016). No geral, estima-se que as variantes no HLA representem cerca de 50% da predisposição genética (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium/IMSGC), (ZHOU, 2016; PATSOPOULOS, 2017).

Como em todas as doenças autoimunes, a apresentação de antígenos mediada pelo complexo HLA resulta ser um fator importante na patogênese, devido a um possível efeito sobre os mecanismos de tolerância central e periférica dos linfócitos, e consequentemente na perda de tolerância específica observada nessas doenças (**Figura 1**).

A partir dos anos 2000, métodos genéticos modernos como: estudos de associação genômica ampla, GWAS, levaram a descoberta de outros genes fora dos locos *MHC* associados a EM tais como as regiões gênicas que contém o receptor α da interleucina 7 (*IL7RA*; 5p13.2), o receptor α da interleucina 2 (*IL2RA*; 10p15.1), o receptor para o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês “Tumor Necrosis Factor”) (*TNFR1*; 12p13), a proteína de morte programada 1 (*PDI*; 2q37.3) (HAFLER, 2007). Como esperado, variantes em genes do sistema imune (SI) resultaram importantes na “arquitetura genética” da EM, e sugeriram que várias vias de sinalizações tanto inatas que adaptativas estariam envolvidas na perturbação inicial do SI periférico, assim como na alteração da reposta da micróglia e das outras células do SNC, contribuindo para o processo autoimune (ORRU, 2013; GUTIERREZ-ARCELUS, 2016).

De modo interessante, foi ressaltado por Baranzini (BARANZINI, 2009) que vários genes e/ou polimorfismos associados à EM foram também associados a outras doenças autoimunes, tais como diabetes tipo I, artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico e doença de Crohn, também associado de forma específica para cada doença de acordo com as suas características, ressaltando assim a heterogeneidade genética ou alélica entre as doenças autoimunes, e isso ao mesmo tempo enfatiza os componentes autoimunes da EM.

Por outro lado, existem evidências de uma contribuição genética também na gravidade da EM como é corroborado pela extrema heterogeneidade do prognóstico em todas as formas da

doença (JOKUBAITIS, 2018). Apesar da dificuldade em definir o estado de doença (ex.: ausência de biomarcadores e/ou de acesso a exames disponíveis; parcial subjetividade da determinação do EDSS) comparado ao estudo do risco de desenvolver a EM, estudos GWAS apontaram para alguns fatores genéticos associados a gravidade e/ou prognóstico da doença. Essas variantes acometem tanto genes expressos no SNC, tais como a plexina-A3/ *PLXA3* (QURESHI, 2017), o sitio de integração de ajuda Abelson 1 /*AHL1* (GRAVES, 2018), envolvidos no metabolismo como a proteína 2 relacionada ao receptor de LDL/*LRP2* (ZHOU, 2017), que genes imunes. Entre eles, o gene das proteínas de choque térmico de 70 kilodaltons/*Hsp70* (BOIOCCHI, 2016), da proteína de ligação a manose/*MBP* (ZHOU, 2017), da morte celular programada-1/*PD-1* (PAWLAK-ADAMSKA, 2017) , o da subunidade da integrina alfa-4/*ITGA4* e o fosfoproteína secretada 1/*SPP1* da osteopontina (DARDIOTIS, 2017). Ressaltamos que os alelos HLA, fortes candidatos para um efeito também na evolução da doença, não resultaram associados a gravidade da EM.

1.3 Inflamassoma e Esclerose Múltipla

Os inflamassomas são complexos citosólicos que se formam em resposta a padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) ou dano (DAMPs), pela interação entre receptores citoplasmáticos da imunidade inata, tais como as proteínas que contêm os domínios NACHT, LRR e PYD (do inglês “NACHT and LRR receptor containing a PYD domain”/NLRP) (ex: NLRP1, NLRP3), a pirina, ou a proteína ausente no melanoma 2 (AIM-2, do inglês “Absent in Melanoma-2”), a proteína adaptadora ASC e a caspase inflamatória, caspase-1. O receptor quando estimulado recruta ASC e a caspase-1, e ativa o processamento e a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL1 β e IL-18 (MARTINON, 2002), (**Figura 2**).

Devido ao seu elevado potencial inflamatório, a ativação do complexo inflamassoma é controlada por vários mecanismos, incluindo o controle da transcrição genica (ex.: NF-kB, IRFs, microRNAs), da meia vida dos seus componentes (ex.: ubiquitinação, nitrosilação), e através da inibição mediada por proteínas citosólicas (ex.: CARD8, proteínas contendo domínio PYD/POPs, ou proteínas contendo domínio CARD/COPs) (LAMKANFI e DIXIT, 2014). A maioria dos componentes do inflamassoma (i.e.: *NLRP3*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B*) é transcrito via NF-kB após a ativação dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRRs) associados a patógenos (PAMPs) ou a dano (DAMPs), ou receptores de citocinas (ex.: TNFR, IL1R) (LAMKANFI e DIXIT, 2014). Tanto PAMPs como DAMPs podem ativar o inflamassoma através de receptores diferentes, alguns extremamente específicos, tais como o NLRC4 e AIM2 que reconhecem flagelina bacteriana e DNA citosólico respectivamente; ou a

pirina que se liga a proteínas do hospedeiro modificadas por toxinas bacterianas; outros com mecanismo de ativação mais abrangentes como o NLRP3, que pode ser ativado por elevadas concentrações extracelulares de ATP (sinal de morte celular no tecido), produção de radicais de oxigênio ou ruptura lisossomal (GUO, 2015).

Figura 2. O inflamassoma e seus receptores. A figura mostra de forma esquemática quatro dos principais receptores do inflamassoma, NLRP1, NLRP3, NAIP e NLRC4, os respectivos indutores, a molécula adaptadora ASC, e a molécula efetora caspase-1, que cliva as formas inativas da IL-1β e IL-18 (pro-IL-1β e pro-IL-18) nas suas respectivas formas biologicamente ativas e liberadas. O indutor do NLRP1 ainda não está identificado em células humanas mas a ativação desse receptor acontece após uma auto-clivagem no próprio domínio FIIND. O NLRP3 é ativado por modificações no citosol causadas por PAMPs ou DAMPs, tais como dano mitocondrial (e liberação de mtDNA, ROS), ruptura lisossomal (e liberação de conteúdo, como catepsinas), ativação de canais iônicos e efluxo de K⁺ (ativação canal purinérgico P2X7). Os componentes do inflamassomas e as suas citocinas pode ser constitutivos ou induzidos através da ativação de receptores de superfície celular para PAMPs e DAMPs, tais como os PRRs (do inglês: *Pattern Recognition Receptors*), ou para citocinas (CKR, do inglês: *Cytokine Receptors*), tanto através da sinalização que culmina na ativação do fator de transcrição NF-κB (como por NLRP3, IL1B) ou dos fatores de transcrição induzidos pelos interferons (IRFs) (como por NLRC4, IL18).

O inflamassoma não está apenas presente em leucócitos, mas também em células e tecidos não estritamente imunes. De acordo com o tipo de célula, a expressão dos componentes

pode ser constitutiva ou induzida. Nos tecidos ou células onde a expressão é constitutiva (ex.: SNC, leucócitos sanguíneos), o inflamassoma pode ser rapidamente ativado com o dano, enquanto que nas células (ex.: macrófagos residentes, células dendríticas, células endoteliais) onde a transcrição dos componentes ou da citocinas (pró-formas biologicamente inativas da IL-1 β e IL-18) deve ser induzida, a ativação do complexo requer um tempo maior (YIN, 2009).

Após a ativação do complexo e a liberação das citocinas, mecanismos de “feed-back” desligam o inflamassoma para controlar o processo inflamatório e restabelecimento da homeostasia tecidual (LATZ, 2013). A disfunção do inflamassoma leva a uma inflamação crônica e é causa ou um co-fator de várias doenças monogênicas (doenças auto inflamatórias hereditárias) ou multifatoriais (ex.: doenças autoimunes, câncer, obesidade, patologias cardiocirculatórias e neurodegenerativas). Tanto causas genéticas (mutações, polimorfismos), quanto infecções crônicas ou insultos estéreis podem levar a desregulação do complexo e da produção de IL-1 β e/ou IL-18 (HOFFMAN e BRODERICK, 2016; PATEL, 2017).

Estudos clínicos mostraram uma aumentada expressão de IL-1 β e IL-18 em pacientes com EM de acordo com a apresentação clínica e gravidade (BALASHOV, 1999; LOSY e NIEZGODA, 2001; KARNI, 2002; MANN, 2002). IL-1 β , além de induzir proliferação de macrófagos e outras células neutroinflamatórias (ex.: microglia, astrócitos) no SNC (SAMA, 2008; IFUKU, 2014), medeia a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ naïve juntamente com IL-18 em Th17 (LASIGLIE, 2011; SHAW, 2012; HARRISON, 2015), assim como também induzem a polarização Th1 (DINARELLO, 1999; DUHEN e CAMPBELL, 2014). Tanto as células Th1 como Th17 desempenham um papel importante na patogênese do modelo experimental da EM a EAE (MURPHY, 2010).

Foi observado que a ausência do NLRP3 inflamassoma atenua a desmielinização e o desenvolvimento da EAE sugerindo que, em particular, esse inflamassoma, possa contribuir para a patogênese da EM, apesar do mecanismo exato da ativação desse receptor ainda não estar totalmente esclarecido na EAE. A hipótese levantada é que o NLRP3 atue como um dos mecanismos de estabelecimento no modelo murino, aumentando a inflamação e através de produção de suas citocinas, dessa forma amplificando a resposta imune, transformando o processo autoimune como um sistema de retroalimentação (FURLAN, 1999; FLETCHER, 2010; GRIS, 2010; INOUE, 2012; SHAW, 2012). É importante destacar que a inibição específica de NLRP3, com a molécula MCC-950, foi capaz de atenuar a apresentação da EAE, enfatizando mais uma vez a contribuição desse receptor especificamente na patogênese da doença (COLL, 2015).

Em humanos, pacientes portadores de mutações de ganho de função em NLRP3 mostraram uma alta comorbidade com EM (SCHUH, 2015), mais uma vez sugerindo que uma aumentada ativação do inflamassoma NLRP3, poderia contribuir para a patogênese da EM. Outros receptores do inflamassoma podem desempenhar um papel na EM incluindo o NLRP1 ou a pirina, como sugerido pela literatura recente sobre a associação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nessas moléculas e a forma familiar da EM (ALPAYCI, 2012; BLASCHEK, 2018). Além disso, variantes em genes que codificam para as citocinas IL-1 β e IL-18 também foram encontradas associadas com a EM, mesmo que com resultados discordantes (risco ou proteção) dependendo do estudo (ISIK, 2013; KARAKAS CELIK, 2014; ORHAN, 2016).

2. HIPÓTESE DE TRABALHO

A EM é uma doença que apresenta tanto características autoimunes e inflamatórias quanto neurodegenerativas. A desregulação do inflamassoma foi já associada a todas essas características tanto em modelos experimentais de doença quanto em estudos de associação genética (FREEMAN e TING, 2016).

Além disso já foi descrito em modelo experimental de EM (EAE) que, em particular, o NLRP3 inflamassoma contribui para o desenvolvimento da doença em camundongo. Através da produção de IL-1 β e IL-18 o inflamassoma auxilia a polarização de uma resposta linfocitária Th17/Th1, que é responsável pelo dano imuno-mediado a bainha de mielina (GRIS, 2010).

Recentemente as variantes *missense* G587S no gene *NLRP1* e R204H no gene *MEFV* foram associadas a EM familiar (EBADI, 2017; MAVER, 2017), sugerindo a contribuição da genética do inflamassoma no desenvolvimento da EM.

Em conjunto, a maioria dos dados de literatura sugerem que a ativação do inflamassoma represente um dos mecanismos patogênicos da EM: (a) ativação do inflamassoma está relacionada a perda de tolerância linfocitária (PELLEGRINI, 2017); (b) elevados níveis de IL-1 β e/ou IL-18 foram encontrados no processo inflamatório anterior ao desenvolvimento de doenças autoimunes (ex.: insulite na T1D) (HARMS, 2015); (c) caspase-1 e IL-1 β foram encontrados nas placas amiloides de cérebros de pacientes com doença de Alzheimer (SHAFTEL, 2008); (d) deficiência de NLRP1 ou NLRP3 melhora quadro neurológico em modelo experimental de dano cerebral (INOUE e SHINOHARA, 2013).

Levando em conta que variantes polimórficas nos genes do inflamassoma estão associadas com diferentes níveis de ativação constitutiva do complexo (ganho- ou perda-de função), e que já foram associadas com doenças autoimunes, inflamatórias neurodegenerativas, a nossa hipótese é que a ativação constitutiva do inflamassoma possa contribuir pela susceptibilidade (genética) individual a desenvolver a EM. Além disso, considerando a heterogeneidade clínica dos pacientes com EM, levantamos a hipótese que um menor limiar de ativação do inflamassoma, consequente de um *background* genético específico, possa afetar também a apresentação clínica dos pacientes. É interessante destacar que polimorfismos de *NLRP1* e *NLRP3* foram associados anteriormente com apresentação neurológica em pacientes LES (PONTILLO, 2015), e com epilepsia refrataria a tratamentos comuns (MENG, 2014; TAN, 2015) ou esquizofrenia (KIM, 2016), enfatizando que, sobretudo em doenças complexas e com apresentação clínica heterogênea, a genética do inflamassoma pode explicar as características de sub-grupos de pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a contribuição do inflamassoma no desenvolvimento de EM com o objetivo final de identificar novos alvos terapêuticos e diagnósticos.

3.2 Objetivos específicos

1. Efetuar um estudo de associação entre polimorfismos em genes do inflamassoma e EM, considerando as diferentes apresentações clínica, com a hipótese que o papel de cada inflamassoma possa ser diverso em pacientes com diferentes formas clínicas de EM e isso auxiliaria a identificação dos mecanismos patogénéticos na base das várias formas clínicas. Além disso, poderia contribuir para identificar marcadores diagnósticos e/ou prognósticos na esclerose múltipla.

2. Avaliar a modulação da ativação do inflamassoma um ensaio em vitro para o estudo do inflamassoma em pacientes com EM. A maioria dos estudos sobre os mecanismos de ativação do inflamassoma são feitos em modelo experimental e precisam ser demonstrados em humanos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casuísticas de esclerose múltipla.

A casuística estudada compreende 265 pacientes com doenças neurológicas desmielinizantes recrutados no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes da Disciplina de Neurologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e Escola Paulista de Medicina (EPM) (São Paulo, SP, Brasil) entre 2006 e 2018. Destes, 210 foram diagnosticados com EM, enquanto os outros 55 receberam diagnóstico de outras doenças neurológicas como: neuromielite ótica (NMO; n=30), neurite ótica (n=10), mielopatia (n=5), síndrome clinicamente isolada (CIS, do inglês: clinically isolated syndrome; n=4), neuropatia óptica inflamatória crônica recorrente (CRION, do inglês: chronic relapsing inflammatory optic neuropathy; n=2), leucodistrofia (n=1), doença de Behçet (n=1), doença de Marburg (n=1), encefalomielite disseminada aguda (n=1).

A casuística de EM compreende pacientes com forma RR (n=118), SP (n=59) e PP (n=32). Os pacientes com EM foram avaliados em 2 momentos (t1 e t2), e na base dos sintomas clínicos foi calculado o EDSS (EDSS_t1 e EDSS_t2). A partir do mais recente EDSS disponível (EDSS_t2) e do tempo de doença (entre t1 e t2), foi calculado o índice de Progressão (IP) da doença.

Os tratamentos utilizados pelos pacientes compreendem IFN- β (Avonex, Rebif 22 ou 44, Betaferon) e Acetato de Glatirâmer. A resposta a tratamento foi avaliada como diminuição do EDSS_t2 comparado com EDSS_t1 (sim ou não).

Comitê de ética aceito sobre a pesquisa Esclerose Múltipla na população brasileira e aprovado pelo CEP da UNIFESP, sob número 0702/05, CAEE: 65903517.5.0000.5505.

As características demográficas e clínicas principais dos pacientes são resumidas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos da coorte caso/controle. As principais características demográficas e clínicas são reportadas para os pacientes neurológicos classificados em pacientes com esclerose múltipla (EM) e pacientes com outras doenças neurológicas (ON), e para o grupo controle. H: homen; M: mulher; DP: desvio padrão; t1: primeira consulta; t2: consulta mais recente; EDSS: Expanded Disability Status Scale; IP: índice de progressão; IFN-β: interferon-beta;

CARACTERÍSTICAS	EM (n= 210)	ON (n= 57)
Características demograficas		
Sexo (H/M), n	41/151	43/12
Idade (anos), média ± DP	48 ± 12	51 ± 12
Características clinicas		
Idade de diagnostico (anos), média ± DP	41 ± 12	36 ± 11
Tempo de doença (anos), média ± DP	16 ± 7	17 ± 5
Idade_t1 (anos), média ± DP	39 ± 10	37 ± 9
Idade_t2 (anos), média ± DP	47 ± 12	44 ± 11
Gravidade no t1 (EDSS_t1), média ± DP	3,40 ± 2,51	3,23 ± 2,36
Gravidade no t2 (EDSS_t2), média ± DP	5,5 ± 2,56	4 ± 2,13
Gravidade no t2, média ± DP	3,50 ± 2,61	3,33 ± 2,45
Gravidade Leve (EDSS_t2 < 3), n	93	15
Gravidade Elevada (EDSS_t2 >3), n	93	20
Progressao (IP), média ± DP	0,19 ± 0,8	0,2 ± 0,01
Progressão Lenta (IP< 0,2), n	94	17
Progressão Rápida (IP> 0,2), n	92	18
Resposta ao tratamento		
IFN-β (resposta positiva), n	21/67	1/1

Tabela 2. Principais características dos pacientes classificados de acordo com a forma clínica da EM. As principais características demográficas e clínicas são reportadas para os pacientes com esclerose múltipla (EM) classificados de acordo com sua forma clínica nas formas remitente recorrente (RR), secundária progressiva (SP) e primária progressiva (PP).

H: homen; M: mulher; DP: desvio padrão; t1: primeira consulta; t2: consulta mais recente; EDSS: Expanded Disability Status Scale; IP: índice de progressão; IFN- β : interferon-beta;

CARACTERÍSTICAS	RR (n=118)	SP (n=59)	PP (n=32)
Carateristica demografica			
Genero (M/F), n	24/94	11/48	15/17
Idade (anos), mediana (min-max)	43 (30-77)	57 (27-75)	62 (45-74)
Carateristica demografica			
Idade de início (anos), mediana (min-max)	27 (10-67)	31 (10-54)	41 (17-58)
Tempo de doença (anos), mediana (min-max)	17,0 (1,6-53,1)	22,2 (8,5-45,1)	21,1 (12,4-55,1)
Idade em t1 (anos), median (min-max)	32 (19-67)	45 (17-64)	51 (33-63)
Idade em t2 (anos), median (min-max)	42 (22-72)	53 (28-73)	57 (41-71)
Gravidade_t1 (EDSS), mediana (min-max)	1 (0-6,5)	6 (0-8)	6 (1-9,5)
Gravidade_t2 (EDSS), mediana (min-max)	1 (0-7)	7 (1,5-9)	7 (6-9,5)
Leve (EDSS ≤ 3) / Grave (EDSS >3), n	82/15	9/50	4/27
Progressão (IP), mediana (min-max)	0,08 (0-0,54)	0,29 (0,06-0,55)	0,35 (0,15-0,56)
Lento (IP <0.2) / Rapido (IP ≥ 0.2)	80/17	13/46	3/27

4.1.2. Casuística para estudo celular *in vitro*.

Para o estudo *in vitro* foi coletado o sangue periférico (cerca de 20 mL) de 9 pacientes com EM dentro da casuística apresentada na seção anterior, que porem atendessem os seguintes critérios:

- Ter recebido o diagnóstico de EM a menos de 5 anos;
- Estar com doença estável no momento da avaliação clínica, definida como sem sinais de novos sintomas neurológicos que caracterizem um surto, nos últimos seis meses e sem progressão da incapacidade neurológica médica pelo EDSS, de pelo menos 1 ponto, nos últimos seis meses;
- Não apresentar infecções virais ou bacterianas nas últimas quatro semanas;
- Não ter tido tratamento com corticoide sistêmico em qualquer dose, por qualquer indicação médica nos últimos três meses;
- Não ter tido tratamento com imunossupressor (ex: Azatioprina, Ciclofosfamida, Teriflunomida, Mitoxantrone) nos últimos seis meses;

- Não ter tido tratamento com Alentuzumabe (do inglês *Alentuzumab*; anticorpo monoclonal kappa IgG1) ou Rituximabe (do inglês *Rituximab*; anticorpo monoclonal quimérico dirigido contra o CD20)

Desta forma excluimos potenciais efeitos de confusão na interpretação dos dados da ativação do inflamassoma *in vitro*.

Os pacientes participaram voluntariamente do estudo após assinatura do TCLE aprovado pelo CEP da UNIFESP, sob número 0702/05, CAEE: 65903517.5.0000.5505.

Os dados demográficos e clínicos principais desses pacientes são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Características dos pacientes EM recrutados para o ensaio funcional.

As principais características demográficas e clínicas são reportadas para os pacientes com esclerose múltipla (EM) recrutados para o isolamento de monócitos e o estudo funcional. Com exceção do EDSS e IP que se referem aos dados da última consulta disponível, os outros parâmetros se referem ao momento da coleta.

H: homem; M: mulher; DP: desvio padrão; t2: consulta mais recente; EDSS: Expanded Disability Status Scale; IP: índice de progressão; IFN- β : interferon-beta;

ID	Sexo	Idade (anos)	Forma Clínica	Tempo de doença (anos)	EDSS_t2	IP_t2	Tratamento
P1	M	20	RR	1,2	0,0	0,0	-
P2	M	21	RR	2,7	0,0	0,0	IFN- β
P3	H	28	RR	11,8	1,0	0,1	-
P4	M	67	RR	18	3,0	0,2	-
P5	M	31	RR	7,4	0,0	0,0	IFN- β
P6	H	34	RR	3,7	1,0	0,3	-
P7	M	35	RR	6,2	1,0	0,2	IFN- β
P8	H	28	SP	8,2	5,0	0,6	-
P9	H	34	RR	12,2	0,0	0,0	IFN- β

4.2 Grupos controle

4.2.1 Grupo controle para estudo de genotipagem.

O grupo controle é constituído por dois grupos anteriormente utilizados em outros estudos como controle de pacientes com melanoma maligno esporádico (grupo 1) (Silva WC et al, 2017) e como controle de pacientes com doença de Parkinson (grupo 2) (dados ainda não publicados). A escolha desses dois grupos foi feita através das características desses indivíduos: além de estarem saudáveis no momento do recrutamento (sem histórico de autoimunidade, câncer e doenças inflamatórias crônicas, ou neurológicas), os critérios de inclusão previam uma idade acima de 55 anos, ou seja, fora do intervalo de idade de risco da EM (30-50 anos).

O DNA genômico destes grupos assim como os dados de genotipagem referentes a alguns entre os SNPs analisados para esse estudo, se encontravam já disponíveis no Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (ICB/USP), e com aprovação do Comitê de Ética.

A junção dos dados de genotipagem desses dois grupos permitiu atingir um número amostral comparável com o grupo de pacientes (n=233). Os principais dados demográficos dos dois grupos de indivíduos são reportados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Dados demográficos do grupo controle.

As principais características demográficas e clínicas são reportadas para os dois grupos de controles negativos para doenças neurológicas, utilizados no estudo de genotipagem.

H: homen; M: mulher; DP: desvio padrão

Carateristica	Grupo 1 (n=137)	Grupo 2 (n=96)	Total (n=233)
Gênero (M/H), n	73/64	76/20	149/84
Idade (anos), média $\pm$ DP	64 $\pm$ 01	56 $\pm$ 7	61.2 $\pm$ 10.8

4.2.2 Grupo controle para estudo *in vitro*.

Concentrados de leucócitos obtidos após plaquetaférese (câmaras de leucorredução ou LRS) de 10 doadores saudáveis (idade média: $30 \pm 1,03$; M/H 7/3) procedentes da região metropolitana de São Paulo (SP, Brasil) e aferentes ao Banco de Sangue do Hospital Alemão Oswaldo Cruz (São Paulo, SP, Brasil) foram utilizadas para isolamento de monócitos que constituíram o grupo controle dos ensaios *in vitro*. Os doadores assinaram o TCLE do banco de sangue consentindo a doação do material biológico de sobra após plaquetaférese para utilização em projetos de pesquisa.

4.3 Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma e genotipagem.

8 SNPs foram selecionados nos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *IL1B* e *IL18*, na base de estudos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (PONTILLO, 2013; PONTILLO, 2012), e/ou de acordo com os dados reportados na literatura (MAVER, 2017; MALHOTRA, 2015; KARAKAS, 2014; ISIK, 2013; FRAYLING, 2007), e considerando uma frequência do alelo menor (MAF) >5%. A lista com a MAF e as referências são reportadas na Tabela 5.

A genotipagem dos SNPs foi efetuada com ensaios alelo-específicos de tipo TaqMan® (*Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific*), e qPCR no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 3.0 (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. O software QuantStudio™ Design Analysis (versão 1.4) foi utilizado para a discriminação alélica, e a obtenção dos genótipos para cada indivíduo.

Tabela 5. Seleção de SNPs Candidatos. A lista de SNPs candidatos selecionados em genes do inflamassoma é relatada com informações básicas, como a identificação de gene (gene ID) e a respectiva posição cromossômica (locus), a identificação do polimorfismo de base única (SNP ID) e a correspondente variação nucleotídica e aminoácídica (quando em uma região codificante) ou indicação da região genica (quando em uma região não codificante), frequência do alélio menor (MAF) na população caucasiana (de acordo com o banco público de dados “HapMap”), o efeito funcional (quando conhecido) e as próprias referências bibliográficas.

Gene ID (locus)	SNP ID	Variação	MAF	Efeito funcional	Ref
<i>NLRP1</i> (17p13.2)	rs12150220	c.1019 A>T (L155H)	T (0.46)	Haplótipo aumentou o processamento de IL-1 β	LEVANDOWSKI, 2013
	rs11651270	c.4015 T>C (M1154V)	C (0.47)		
<i>NLRP3</i> (1q44)	rs10754558	c.3745 C>G (3'UTR)	G (0.36)	Aumentou a estabilidade do mRNA NLRP3	HITOMI, 2009
	rs35829419	c.2859 C>A (Q705K)	A (0.05)	NLRP3 inflamassoma sobre ativação (aumento da produção de IL-1 β e IL-18)	VERMA, 2012
<i>NLRC4</i> (2p22.3)	rs479333	c.-119+649 C>G (intron)	G (0.31)	Diminuição da expressão de NLRC4; Concentração sérica reduzida de IL-18	ZELLER, 2015; MATTEINI, 2015
<i>IL1B</i> (2q14.1)	rs16944	c.-511 C>T (promoter)	T (0.36)	Produção aumentada de IL-1 β induzida por LPS	HALL, 2004
<i>IL18</i> (11q23.1)	rs1834481	c.79+1871 G>C (intron)	C (0.23)	Redução sérica da concentração de IL-18	HE, 2010.
	rs5744256	c.80-1919 T>C (intron)	C (0.22)	Redução sérica da concentração de IL-18	FRAYLING, 2007

4.4 Análise da distribuição dos SNPs.

A distribuição dos SNPs foi comparada (a) na coorte de pacientes EM e controles (estudo caso/controle); (b) entre pacientes EM e pacientes com diagnóstico diferencial de EM; (c) nos pacientes EM classificados de acordo com a gravidade da doença (medida através da EDSS), a evolução da doença (medida através do IP), a resposta ao tratamento; (d) nos pacientes EM classificados de acordo com a forma clínica (RR, SP, PP).

A análise multivariada e modelo geral linear (GLM) foi utilizada, incluindo variáveis de correção de acordo com os grupos analisados:

- (a) Gênero e idade
- (b) Gênero, idade, idade de início da doença
- (c) Gênero, idade, idade de início da doença, tempo de doença

Aplicamos a correção para comparações múltiplas independentes de Bonferroni e ajustamos o nível de significância de $p=0,05$ a $p=0,013$ ($0,05/4$), considerando que os 8 SNPs estão em 4 *loci* independentes.

O software R (www.r-project.org) foi utilizado para a análise de associação multivariada e para obtenção de modelos de herança (package "SNP assoc" version 1.5-2). O software Haploview foi utilizado para investigar o desequilíbrio de ligação (LD, do inglês "linkage disequilibrium") e para derivar os haplótipos.

4.5 Obtenção de monócitos do sangue periférico

As células mononucleadas de sangue periférico (PBMC, do inglês "*peripheral blood mononuclear cells*") foram obtidas a partir da amostra de sangue total de pacientes com EM ou a partir das câmaras LRS de doadores saudáveis, através do gradiente de densidade com uso de Ficoll-Paque (*GE Healthcare, Biosciences*).

Os monócitos foram separados das demais PBMC por adesão em placas de cultura. Em breve: 4×10^6 PBMC/poço foram distribuídos em placas de 24 poços (Corning Costar). Após 2 horas de adesão a 37°C e 5% CO_2 , os poços foram lavados com solução salina tamponada (PBS, do inglês "*Phosphate Buffer Saline*"; *Sigma-Aldrich*) por 3 vezes para remover as células não aderentes. Os monócitos aderidos no poço (cerca de 10% dos PBMC) foram mantidos em cultura até o dia seguinte em meio RPMI-1640 (*Gibco, Thermo Fisher Scientific*) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês "*Fetal Bovine Serum*"; *Gibco*)

4.6 Ensaio de ativação do inflamassoma nos monócitos isolados de pacientes com EM

Os monócitos foram desafiados com $1 \mu\text{g/mL}$ de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa O111:B4; *Sigma-Aldrich*) por 3 e 24 horas, e depois com 1 mM de adenosina trifosfato (ATP; *Sigma-Aldrich*) por 15 minutos antes do tempo total, de acordo com o protocolo de ativação do NLRP3 inflamassoma (GATTORNO, 2007). O sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem das citocinas IL- 1β , IL-18 e TNF, enquanto as células foram lisadas para extração de RNA e posterior avaliação da expressão gênica.

4.7 Avaliação da concentração de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultura

A concentração de IL- 1β , IL18 e TNF no sobrenadante de cultura dos monócitos foi determinada por ELISA comercial de acordo com as instruções dos fabricantes (IL1 β com kit da *Biolegend* (*Human IL-1beta ELISA MAX Deluxe - BioLegend*); IL-18 com kit RD (ELISA IL-18 / IL-1F4 humano) e TNF, com kit da *eBioscience* (*Human TNF alpha ELISA Ready-SET-*

Go!TM). O programa GraphPad Prism (versão 7.0) foi utilizado para analisar a natureza dos dados (paramétrico ou não paramétrico) e para testar as diferenças de concentração das citocinas nos grupos estudados. As concentrações das citocinas estão apresentadas em pg/mL.

4.8 Extração de RNA, retrotranscrição e análise da expressão gênica relativa.

O RNA total foi isolado das células utilizando o RNAqueous® Micro kit (*Ambion, Thermo Fisher Scientific*) de acordo com as instruções dos fabricantes. A pureza e quantidade do RNA foram avaliadas por meio de análise espectrofotométrica no equipamento Nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*). A concentração (ng/μL) e pureza (280/260 nm) foram utilizadas para avaliar a pureza das amostras. 300 ng de RNA total foram retrotranscritos utilizando o SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with PlatinumTM, de acordo com as instruções do fabricante (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*). Após a síntese do cDNA, o produto foi utilizado para a amplificação dos genes *NLRC4*, *NAIP*, *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18*, utilizando ensaios gene-específicos de tipo TaqMan® (*Applied Biosystems*) e qPCR na plataforma de Real Time PCR QuantStudio 3.0 (*Applied Biosystems*). O software QuantStudioTM Design Analysis (versão 1.4) foi utilizado para obter os dados de Cycle Threshold (Ct) para cada gene. Os dados de amplificação com Ct >35 foram excluídos da análise. A expressão relativa dos genes alvo foi calculada usando o método comparativo de Ct, proposto por SCHMITTGEN e LIVAK (2008). Para normalização dos dados de Ct (ΔCt) foi utilizado o gene que codifica a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). A modulação gênica (Fold Change, $FC=2^{-\Delta\Delta Ct}$) foi avaliada comparando a expressão genica nas células estimuladas (ΔCt_{est}) e não estimuladas (ΔCt_{ns}).

O teste t pareado foi utilizado para avaliar a significância da modulação de expressão gênica entre células estimulada e não estimulada. O teste t múltiplo pareado foi utilizado para comparar a expressão genica entre pacientes e controles. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$. Os dados foram apresentados tanto em gráficos de barra quanto em *heatmap*, com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 7.0).

4.9 Análise *in silico* da expressão genica do inflamassoma no SNC.

Extraímos dados da expressão relativa dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *MEFV*, *CASPASE 1*, *CASPASE 4*, *CASPASE 5*, *IL1B* e *IL18*, em lesões cerebrais de pacientes com EM ou indivíduos sem comprometimento neurológico, comparamos o grupo saudável com o grupo com EM, e obtivemos os dados a partir do banco de dados públicos Gene Expression Omnibus (GEO) do relativo ao artigo de (FREIESLEBEN, 2016).

Os dados de expressão foram calculados como $2^{-\Delta C_t}$ e representados em um gráfico tipo *heatmap* com auxílio do programa GraphPad Prism (versão 7.0).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados e discutidos em duas sessões separadas (**PARTE I e II**) para facilitar o entendimento dos dados.

5.1 PARTE I – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO

5.1.1 Análise dos SNPs selecionados para o estudo.

Escolhemos 8 polimorfismos de base única, nos genes dos receptores *NLRP1* (L155H/rs12150220, M1126V/rs11651270), *NLRP3* (Q705K/rs35829419, rs10754558 na região 3' UTR) e *NLRC4* (rs479333 na região intrônica), das citocinas *IL1B* (-511C/T/rs16944 no promotor) e *IL18* (rs1834481 e rs5744256 em regiões intrônicas), foram genotipados na coorte neurológica e também na coorte caso/controle.

A distribuição dos SNPs na coorte resultou de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p_{HW} \geq 0.05$) (**Tabela 6**), portanto todos os SNPs foram incluídos na análise de associação.

Tabela 6. Distribuição dos polimorfismos de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, na coorte caso/controle. Um resumo do equilíbrio de HWE, com relação aos SNPs e nos controles (C) e nos pacientes com esclerose múltipla (EM). Os dados representados C + EM e também cada coorte separadamente, considerando o valor de ($p_{HW} \geq 0.05$).

SNP ID	C+EM	C	EM
rs12150220	1.000	0.426	0.645
rs11651270	0.599	0.076	0.769
rs10754558	0.206	1.000	0.215
rs35829419	1.0	1.0	1.0
rs479333	0.792	1.000	0.658
rs16944	0.423	1.000	0.362
rs5744256	0.496	1.000	0.633
rs1834481	0.820	1.000	1.000
rs2230911	1.000	1.000	1.000

Considerando a miscigenação da população brasileira, comparamos a frequência dos SNPs do grupo controle com a frequência reportada em bancos de dados públicos (HapMap, 1000Genome) tanto para a população caucasiana (CEU) quanto para a africana (YRI) considerando as características demográficas da nossa coorte (70% europeus, 30% africanos; **Tabelas 1 e 4** na sessão de materiais e métodos).

Como esperado, a frequência alélica dos SNPs no nosso grupo controle se encontrou parecida ($p > 0.05$) com aquela reportada para a população caucasiana (CEU) ou com uma média entre a caucasiana e africana (CEU+YRI), **Tabela 7**.

Não existindo diferenças estatisticamente significativas decidimos não incluir o dado relativo a origem étnica na análise multivariada.

Tabela 7. Frequências dos SNPs analisados no grupo controle

O identificativo do gene (gene ID), o número de identificação da variante (SNP ID), são reportados para os SNPs incluídos no estudo, assim como a frequência do alelo menor (MAF) dos SNPs no grupo controle e nas populações caucasiana (CEU) e africana (YRI). As frequências alélicas das populações CEU e YRI foram obtidas a partir dos bancos de dados públicos HapMap e 1000Genome (*). A distribuição dos SNPs (alelos) no grupo controle e nas populações CEU, YRI ou CEU+YRI foi comparada com Fisher test (matriz 2x2). Diferenças com Fisher test p-value < 0.05 foram consideradas significativas.

Gene ID	SNP ID	MAF	Grupo controle (n=233)	Bancos de dados públicos		
				CEU	YRI	CEU+YRI
<i>NLRP1</i>	rs12150220	T	0,31	0,46	0,02*	0,24
	rs11651270	C	0,41	0,47	0,50	0,49
<i>NLRP3</i>	rs10754558	G	0,33	0,36	0,23	0,30
	rs35829419	A	0,09	0,06	0,01*	0,04
<i>NLRC4</i>	rs479333	C	0,33	0,38*	0,29	0,34
<i>IL1B</i>	rs16944	T	0,36	0,36	0,48	0,42
<i>IL18</i>	rs5744256	C	0,13	0,22	0,01*	0,12
	rs1834481	C	0,08	0,23	0,01*	0,12

Em seguida, verificamos a existência do desequilíbrio de ligação entre os SNPs localizados no mesmo gene (*NLRP1*, *NLRP3*, *IL18*) ou *loci* gênico (*NLRC4* e *IL1B*). Como mostrado na Figura 3 e Tabela 7, existe um moderado desequilíbrio de ligação entre essas variantes na coorte caso/controle analisada.

Figura 3. Resultado da análise de desequilíbrio de ligação (LD) para os SNPs analisados.

Os resultados da análise de LD são reportados como gráfico. Estão indicados os identificativos dos polimorfismos de base única selecionados para o estudo (SNP ID), e os resultados da análise de LD entre pares de SNPs (expressos como D') obtida com o programa Haploview.

O esquema de cor apresentados indica:

branco: $D' < 1$ e $LOD < 2$; tons de rosa: $D' < 1$ e $LOD \geq 2$; vermelho intenso: $D' = 1$ e $LOD \geq 2$.

Tabela 7. Resultados da análise de desequilíbrio de ligação (LD) dos SNPs nos genes do inflamassoma. São reportados os resultados da análise de LD entre os SNPs no mesmo gene ou no mesmo locus gênico, em termo de D' , LOD e r^2 . O intervalo de confiança 95% (valor menor-maior) da análise e também indicado para cada par de variantes.

SNP1	SNP2	D'	LOD	r^2	95%CI
rs11651270	rs12150220	0.428	12,96	0.163	0.33-0.51
rs5744256	rs1834481	0.632	24,80	0.39	0.54-0.71
rs35829419	rs10754558	0.717	1,82	0.022	0.28-0.90
rs16944	rs47944	0.512	2,43	0.46	0.67-0.89

5.1.2 Distribuição de polimorfismos de base única selecionados em genes do inflamassoma na corte caso/controle de esclerose múltipla.

Com objetivo de avaliar a contribuição dos 8 SNPs selecionados na susceptibilidade a EM foi efetuada uma análise multivariada da distribuição genotípica dos SNPs na coorte caso/controle de EM constituída por 210 pacientes com EM e 233 indivíduos controles. Incluímos as variáveis idade e gênero na análise como variáveis de ajuste.

Na **Tabela 8** estão apresentados os resultados da comparação da distribuição dos SNPs nos dois grupos. A análise multivariada reportou um $p\text{-value} < 0,05$ para os polimorfismos da *IL18* rs1834481 e rs5744256, enquanto que não houve diferença estatística entre pacientes e controles para os SNPs dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *IL1B*, ($p > 0.05$). Os detalhes dos resultados da análise foram reportados na Tabela 10 apenas para os SNPs da *IL18*.

O genótipo polimórfico G/G da variante rs1834481 resultou significativamente mais frequente nos controles (0,16) que nos pacientes (0,05) de acordo com um modelo recessivo de herança ($p=0.010$; $OR=0,30$). A correção por gênero e idade não afetou o resultado ($p_{aj}=0.010$; $OR_{aj}=0.26$). De modo semelhante, o genótipo polimórfico G/G do SNP rs5744256 resultou mais frequente nos controles (0,06) que nos pacientes (0,02) ($p_{aj}=0.027$; $OR_{aj}=0.29$, de acordo com um modelo recessivo de herança), porem essa diferença não atingiu valor estatístico após a correção de Bonferroni.

Tabela 8. Resultados da análise de distribuição dos SNPs do inflamassoma na coorte caso/controle de EM. São reportados os nomes dos genes (gene ID), os identificativos dos SNPs (SNP ID), os genótipos, o número absoluto de indivíduos e as frequências entre parêntese para cada genótipo, assim como os valores de p (p), os valores de p ajustados por idade e sexo (p_{aj}), o Odds Ratio (OR) e respectivo intervalo de confiança (95% CI), de acordo com a análise multivariada. Em negrito evidenciamos os valores de $p < 0.005$; em itálico os valores de $p < 0.05$.

		EM (n=210)		C (n=233)		
Gene ID	SNP ID	Genótipos	Indivíduos, n (frequência)	Indivíduos, n (frequência)	p-value	p.value (adj)
NLRP1	rs12150220	A/A	79 (0,38)	86 (0,37)	0,258	0,264
		A/T	105 (0,50)	106 (0,45)		
		T/T	26 (0,12)	41 (0,18)		
	rs11651270	T/T	61 (0,29)	73 (0,37)	0,806	0,866
		C/T	103 (0,49)	113 (0,44)		
C/C		46 (0,22)	47 (0,19)			
NLRP3	rs35829419	C/C	201 (0,96)	214 (0,92)	0,541	0,706
		C/A	9 (0,04)	19 (0,08)		
	rs10754558	A/A	85 (0,40)	97 (0,42)	0,596	0,866
		C/G	94 (0,45)	95 (0,41)		
		G/G	31 (0,15)	41 (0,18)		
NLRC4	rs479333	G/G	67 (0,32)	89 (0,38)	0,143	0,201
		C/G	108 (0,51)	89 (0,38)		
		C/C	35 (0,17)	55 (0,24)		
IL1B	rs16944	C/C	77 (0,37)	80 (0,34)	0,024	0,086
		C/T	104 (0,49)	100 (0,43)		
		T/T	29 (0,14)	53 (0,23)		
IL18	rs5744256	A/A	138 (0,66)	162 (0,70)	0,053	0,027
		A/G	67 (0,32)	57 (0,24)		
		G/G	5 (0,02)	14 (0,06)		
	rs1834481	C/C	134 (0,64)	134 (0,60)	0,010	0,010
		C/G	65 (0,31)	56 (0,24)		
		G/G	11 (0,05)	38 (0,16)		

Tabela 9. Resultados de associação dos SNPs em *IL1B* e *IL18* com o estudo caso/controle.

São reportados os nomes dos genes (gene ID), os identificativos dos SNPs (SNP ID), os genótipos, as frequências para cada genótipo, assim como os valores de p ajustados por idade e sexo (p_{aj}), assim como os valores absolutos e ajudados do Odds Ratio (OR) e respectivo intervalo de confiança (95% CI), de acordo com a análise multivariada. Em negrito evidenciamos os valores de $p < 0.005$, de acordo com o modelo recessivo de herança.

SNP ID	Genótipos	EM (n=210)	C (n=233)	p	p_{adj}	OR _{adj} (95% IC)
rs5744256	A/A+A/G	137 ± 66 (0.98)	163 ± 56 (0.94)	0,053	0,027	0.29
	G/G	6 (0.02)	14 (0.06)			0.09 - 0.93
rs1834481	C/C+C/G	140 ± 63 (0.97)	163 ± 49 (0.91)	0,010	0,010	0.26
	G/G	6 (0.03)	21 (0.09)			0.09 - 0.77

Considerando que os dois SNPs estão em moderado LD, efetuamos a análise da distribuição dos rs1834481 e rs5744256 em conjunto na coorte caso/controle para verificar um eventual efeito aditivo dos alelos ou dos genótipos. Diferentemente da quanto esperado não observamos nenhum efeito combinatório nem dos alelos menores (haplotipo: rs18344481/G-rs5744256/G) nem dos genótipos (genótipos combinados: rs18344481 G/G + rs5744256 G/G) ($p < 0.05$).

Em conjunto esses resultados sugerem que o polimorfismo rs1834481, localizado no íntron 3 do gene *IL18* e anteriormente associado a baixos níveis plasmáticos de IL-18 (HE, 2010; MARTINEZ-HERVAS, 2015), represente um fator de proteção contra o desenvolvimento da esclerose múltipla, corroborando estudos que evidenciaram o papel da ativação do inflamassoma e suas citocinas relacionadas na patogênese da EM, tanto no modelo experimental da EAE (SHAW, 2010) quanto no ser humano (SCHUH, 2015).

5.1.3 Avaliação da contribuição dos SNPs selecionados na gravidade da EM

Considerando que existe uma grande heterogeneidade na apresentação clínica da EM, tanto em termo de formas clínicas da doença, quanto em gravidade e rapidez de progressão (Lublin FD, et al, 2014), decidimos em seguida avaliar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica dos pacientes, considerando a escala de desabilidade (EDSS) e o índice de progressão (IP).

A distribuição dos SNPs foi avaliada tanto considerando os parâmetros como variáveis contínuas, quanto como variáveis categóricas binárias após estabelecimento de um limiar (“*cut-off*”). Para o EDSS estabelecemos um “*cut-off*” igual a 3, sendo que abaixo de 3 há um comprometimento menor das funções neuromotoras, e acima de 3 há um maior comprometimento do quadro clínico geral. Para o IP, usamos o “*cut-off*” de 0,2 proposto por POSER (1982), sendo que abaixo de 0,2 a doença evolui num tempo maior e com menor gravidade, e acima de 0,2 há um quadro clínico mais grave e uma progressão rápida da doença.

Foram incluídas na análise multivariada idade, gênero, idade no início da doença e tempo de doença como variáveis de correção. Os resultados da análise são apresentados de forma resumida na **Tabela 10**.

Tabela 10. Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma com a gravidade da EM. São reportados resumidamente os resultados da análise multivariada da distribuição dos SNPs selecionado de acordo com a gravidade da esclerose múltipla (EM), em termo de valores de p brutos (p) e ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}). Em negrito são indicados os valores de $p \leq 0,006$, em itálico são indicados $p < 0,05$.

SNP ID: identificativo do polimorfismo de base única; EDSS: do inglês Expanded Disability Status Scale; IP: índice de progressão.

SNP ID	Gravidade da EM (média EDSS $\pm$ DP)		Gravidade da EM (grave vs leve)		Progressão da EM (média IP $\pm$ DP)		Progressão da EM (rápida vs lenta)	
	P	P_{aj}	P	P_{aj}	P	P_{aj}	P	P_{aj}
rs12150220	0,511	0,835	0,428	0,737	0,907	0,723	0,529	0,742
rs11651270	0,282	0,558	0,155	0,059	0,616	0,565	0,226	0,366
rs10754558	0,551	0,672	0,296	0,243	0,261	0,427	0,355	0,294
rs35829419	0,141	0,051	0,074	0,020	0,020	0,020	0,014	0,001
rs479333	0,467	0,112	0,361	0,021	0,206	0,024	0,430	0,065
rs16944	0,006	0,004	0,003	8 exp-4	8 exp-5	0,001	9 exp-4	0,008
rs1834481	0,917	0,569	0,919	0,594	0,710	0,675	0,919	0,594
rs5744256	0,959	0,584	0,958	0,673	0,805	0,787	0,990	0,679

Dentre os polimorfismos analisados, apenas o polimorfismo rs16944, no gene *IL1B* resultou estatisticamente associado com a gravidade da EM, sendo que o alelo polimórfico T resultou mais frequente nos pacientes com índices mais graves de acordo com um modelo dominante de herança (C/T+T/T), tanto considerando o grupo de gravidade (0.74), ou o valor de EDSS (C/T+T/T: 4,61 + 0,27, *versus*: C/C: 3,34 ± 0,37; $p_{aj}=0,004$. Além disso o mesmo polimorfismo resultou associado também a um maior IP (C/T+ T/T: 0,24 ± 0.02, *versus* C/C: 0,15 ± 0,02; $p_{aj}= 0,009$).

A variante rs35829419 no gene *NLRP3* resultou também mais frequente nos pacientes com um maior valor de EDSS (A/C: 5.02 + 0.58, *versus* C/C: 4.09 + 0.22; $p_{aj}=0.050$), porem essa diferença não resultou estatisticamente significativa após correção de Bonferroni. E o mesmo polimorfismo resultou associado também a um maior IP (A/C: 0,34 ± 0.05, *versus* C/C: 0,20 ± 0,01; $p_{aj}= 0,025$), porem novamente essa diferença não resultou estatisticamente significativa após correção de Bonferroni.

Tabela 11. Resultados detalhados da análise de distribuição das variantes significativamente associadas com a gravidade da EM.

São detalhados os resultados da análise multivariata da distribuição dos SNPs rs16944, **rs35829419**, **rs47933** de acordo com a gravidade da esclerose múltipla (EM). São reportados o identificador da variante (SNP ID), os genótipos e a distribuição deles nos grupos considerados, os valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}), de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC) para análise de variáveis binárias, ou de média e erro padrão (EP) com os respectivos valores de diferença (Dif) e intervalos de confiança (95% IC) para análise de variáveis contínuas/categóricas.

SNP ID: identificador do polimorfismo de base única; Ref: genótipo de referencia; EDSS: do inglês Expanded Disability Status Scale; n: número; freq.: frequência.

Gravidade (EDSS)						
SNP ID	Genótipo	EM leve (n=93)	EM grave (n=93)	p_{adj}	OR	95% IC
rs35829419	C/C	92 (0.99)	87 (0.93)	0.011	Ref	
	C/A	1 (0.01)	6 (0.07)		11.47	1.23 – 106.9
rs16944	C/C	39 (0.42)	24 (0.26)	0.015	Ref	
	C/T+T/T	44 + 10 (0.58)	53 + 16 (0.74)		2.40	1.17– 4.94
SNP ID	Genótipo	Indivíduos (n, freq)	EDSS (média ± EP)	p_{adj}	Dif	95% CI
rs16944	C/C	63 (0.34)	3.38 ± 0.38	0.009	Ref	
	C/T+T/T	97+26 (0.66)	4.58 ± 0.27		1.10	0.29 - 1.92

Tabela 12. Resultados detalhados da análise de distribuição das variantes significativamente associadas com a progressão da EM.

São detalhados os resultados da análise multivariata da distribuição dos SNPs rs16944, **rs35829419**, **rs479333** de acordo com a progressão da esclerose múltipla (EM). São reportados o identificador da variante (SNP ID), os genótipos e a distribuição deles nos grupos considerados, os valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{adj}), de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC) para análise de variáveis binárias, ou de média e erro padrão (EP) com os respectivos valores de diferença (Dif) e intervalos de confiança (95% IC) para análise de variáveis contínuas/categóricas.

SNP ID: identificador do polimorfismo de base única; Ref: genótipo de referência; IP: índice de progressão; n: número; freq.: frequência.

Progressao (IP)						
SNP ID	Genótipo	EM lenta (n=94)	EM rapida (n=92)	p_{adj}	OR	95% CI
rs35829419	C/C	94 (100)	85 (0.92)	6.6 exp-4	Ref	
	C/A	0	7 (0.08)		NC	NC
rs479333	G/G	23 (0.24)	39 (0.42)	0.002	Ref	
	G/C+C/C	53+18 (0.76)	40+13 (0.58)		0.35	0.17 -0.69
rs16944	C/C	42 (0.45)	21 (0.23)	0.004	Ref	
	C/T+T/T	44 + 8 (0.55)	53+18 (0.77)		2.56	1.33-4.92
SNP ID	Genótipo	Indivíduos (n, freq)	IP (média ± EP)	p_{adj}	Dif	95% CI
rs35829419	C/C	169 (0.91)	0.20 ± 0.01	0.015	Ref	
	C/A	17 (0.09)	0.33 ± 0.05		0.15	0.03-0.25
rs479333	G/G	61 (0.33)	0.23 ± 0.02	0.024	Ref	
	G/C+C/C	97+28 (0.67)	0.19 ± 0.01		-0.05	-0.10-0.01
rs16944	C/C	61 (0.33)	0.15 ± 0.02	0.002	Ref	
	C/T+T/T	93 + 32 (0.67)	0.23 ± 0.01		0.075	0.03-0.12

Em seguida, avaliamos um possível efeito combinatório entre os genótipos das variantes rs16944 e rs35829419 com relação ao EDSS ou ao IP, porem talvez pela baixa MAF da variante rs35829419 não encontramos nenhum resultado estatisticamente significativo ($p>0,05$).

Em conjunto, estes resultados demonstram um papel de risco para NLRP3 rs35829419 e IL1B rs16944 em relação à gravidade e prognóstico da EM. Ambas as variantes resultam na

ativação constitutiva do inflamassoma, sendo rs35829419 uma variação missense (Q705K) no receptor NLRP3 levando ao aumento da produção de IL-1 β (VERMA, 2012), e rs16944 um polimorfismo promotor (-511 C> T) conhecido por aumentar a transcrição do gene IL1B e consequentemente, a disponibilidade de pró-IL-1 β (HALL, 2004).

5.1.4 Avaliação da contribuição de variantes do inflamassoma na forma clínica da EM

Quando passamos a analisar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica da EM, primeiramente consideramos a hipótese que o inflamassoma poderia afetar de formas diferentes a EM dependendo do subtipo clínico, sendo conhecido que as formas clínicas apresentam características distintas e não são apenas fases da EM (DENDROU, 2015). Portanto, comparamos a distribuição dos 8 SNPs genotipados entre as três formas de apresentação clínica presentes na nossa casuística: a forma remitente recorrente (RR, n=118), a primária progressiva (PP, n=32) e a secundária progressiva (SP, n=59). (Tabela 13)

Para essa análise, comparamos as frequências dos SNPs entre os grupos (a) RR (n=118) e formas progressivas (n=91); (b) RR e SP (n=118 e 59); (c) RR e PP (n=118 e 32); (d) SP e PP (n=59 e 32).

Na análise foram incluídas como variáveis de ajuste: gênero, idade e idade início da doença, IP. Enfatizamos que de acordo com os dados reportados na Tabela 2 (na sessão matérias e métodos) não houve diferenças significativas das variáveis idade, idade de início da doença e gênero entre os grupos analisados, mas houve entre os valores de IP por isso decidimos incluir também essa variável na análise.

Devido ao número amostral limitado de pacientes SP e PP, inicialmente comparamos o grupo das RR e das formas progressivas agrupadas (SP+PP) (Tabela 14)

A variante rs35829419 resultou mais frequente na forma SP (0,07) que na RR (0,03; $p_{adj}=0,037$) ou na PP (0; $p_{adj}=0,005$). De modo semelhante a outra variante polimórfica no gene *NLRP3*, rs10754558, resultou mais frequente na forma SP (0,18) quando comparada a RR (0,16; $p=0,024$).

Tabela 13. Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma com a forma clínica da esclerose múltipla. São reportados resumidamente os resultados da análise multivariata da distribuição dos SNPs selecionado de acordo com a forma clínica da esclerose múltipla (EM), em termo de valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}). Em negrito são indicados os valores de $p \leq 0,006$, em itálico são indicados $p < 0,05$.

SNP ID: identificativo do polimorfismo de base única; RR: esclerose múltipla remittente recorrente; SP: esclerose múltipla secundária progressiva; PP: esclerose múltipla primária progressiva

SNP ID	RR (n=118)	SP (n=59)	PP (n=32)	RR vs P	RR vs SP	RR vs PP	SP vs PP
				p^{aj}	p^{aj}	p^{aj}	p^{aj}
rs12150220	0.10	0.15	0.16	0,571	0,436	0,674	0,504
rs11651270	0.18	0.23	0.28	0,521	0,203	0,577	0,895
rs10754558	0.16	0.18	0.16	0,409	0,024	0,593	0,422
rs35829419	0.05	0.10	0.01	0,635	0,037	0,853	0,005
rs479333	0.22	0.06	0.25	0,065	0,425	0,047	0,091
rs16944	0.11	0.23	0.09	0,093	0,146	0,127	0,040
rs1834481	0.09	0.05	0.06	0,504	0,760	0,497	0,653
rs5744256	0.04	0.03	0.06	0,798	0,554	0,915	0,327

Tabela 14. Resultados detalhados da análise de distribuição da variantes rs16944 com a forma progressiva da EM. São detalhados os resultados da análise multivariata da distribuição do SNP rs16944 nos grupos de pacientes com esclerose múltipla remittente recorrente (RR) ou com as formas progressivas da doença (P). São reportados os genótipos e a distribuição deles nos grupos considerados, os valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}), de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC)

rs16944 genotypes	RR (n=118)	P (n=91)	P_{adj}	OR _{adj} (95% IC)
C/C	48 (0.41)	25 (0.27)	0.004	2.11 (1.25 – 3.56)
C/T	56 (0.47)	48 (0.53)		
T/T	14 (0.12)	18 (0.20)		

Foi executada também a análise haplótica para os SNPs no gene *NLRP3* (rs35829419/A- rs10754558/G), e a combinatória para os SNPs *NLRP3* rs35829419 C/A + *CARD8* rs2043211 T/T, e rs35829419 C/A + *IL1B* rs16944 T/T, porém sem resultados estatisticamente significativo ($p > 0,05$).

Em conjunto, esses dados confirmam que a ativação constitutiva do *NLRP3* inflamassoma (variantes rs35829419, rs10754558 e rs16944) é fator de risco para formas progressivas, que são as formas mais graves da EM.

5.1.5 Contribuição da genética do inflamassoma na resposta ao tratamento para EM

Malhotra e colegas (2015) reportaram a associação entre polimorfismos ganho de função de NLRP3 e resposta ao tratamento com IFN- β em pacientes EM. Com objetivo de replicar esse dado, analisamos a distribuição dos SNPs de acordo com a resposta ao tratamento a IFN- β no nosso grupo de pacientes com EM (n=91) (Tabela 15).

Tabela 15. Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma com a resposta a tratamento com IFN- β em pacientes com EM. São reportados os resultados da análise multivariata da distribuição dos SNPs selecionado de acordo com a resposta ao tratamento com IFN- β nos pacientes com esclerose múltipla (EM), em termo de valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}) e os respectivos valores de Odds Ratio (OR) e intervalos de confiança (95% IC). Em negrito são indicados os valores de $p \leq 0,006$, em itálico são indicados $p < 0,05$. Gene ID: identificativo do gene; SNP ID: identificativo do polimorfismo de base única; Bons: bons respondedores ao tratamento com IFN- β ; Mal: mal respondedores ao tratamento com IFN- β .

Gene ID	SNP ID	Genotipo	Bons (n=24)	Maus (n=67)	P_{adj}	OR (95% IC)
<i>NLRP1</i>	rs12150220	A/A+A/T	11+12 (0.95)	25+34 (0.88)	0,242	Ref
		T/T	1 (0.05)	8 (0.12)		0.32 (0.04 – 2.76)
	rs11651270	T/T + C/T	8+13 (0.86)	22+31 (0.79)	0,442	Ref
		C/C	3 (0.14)	14 (0.21)		0.59 (0.15 – 2.36)
<i>NLRP3</i>	rs10754558	C/C+C/G	15 + 5 (0.83)	30 +7 (0.55)	0,017	Ref
		G/G	4 (0.17)	30 (0.45)		25.90 (0.95– 707.5)
	rs35829419	C/C	24 (1.0)	63 (0.94)	0,166	Ref
		A/C	0	4 (0.06)		NC
<i>NLRC4</i>	rs479333	G/G	2 (0.10)	25 (0.38)	0,006	Ref
		C/G+C/C	17+5 (90)	28+14 (0.62)		6.4 (1.33 – 30.5)
<i>IL1B</i>	rs16944	G/G + G/A	10+10 (0.84)	20+33 (0.79)	0,684	Ref
		A/A	4 (0.16)	14 (0.21)		0.75 (0.18-3.06)
<i>IL18</i>	rs1834481	C/C	14 (0.57)	52 (0.77)	0,108	Ref
		C/G+G/G	9+1 (0.43)	15 (0.23)		2.41 (0.80 -7.30)
	rs5744256	A/A	14 (0.57)	50 (0.75)	0,124	Ref
		A/G+G/G	9 +1 (0.43)	17 (0.25)		2.30 (0.77 – 6.88)

Ao tentar replicar achados prévios sobre a associação entre NLRP3 Q705K e resposta ao tratamento com IFN- β em pacientes com EM (MALHOTRA, 2015), executamos análise multivariada comparando a distribuição de SNPs entre respondedores e não respondedores ao tratamento com IFN- β . Intrigantemente, os SNPs de NLRP3 não se associaram à resposta ao tratamento, porém a variante NLRC4 rs479333 resultou significativamente mais frequente em bons respondedores (0,90) do que nos maus (0,62) ($p_{adj} = 0,006$; $OR_{adj} = 6,4$) de acordo um modelo dominante de herança, sugerindo que a variante rs479333 contribui para uma resposta mais eficaz ao tratamento.

Além disso, estes resultados sugerem que uma ativação constitutiva do NLRP3 desempenha um papel importante na ativação do inflamassoma em pacientes com EM. Como descobertas originais, o NLRC4, possivelmente através da modulação do nível de IL-18 (Matteini, 2014), também parece desempenhar um papel na patogênese da EM.

5.1.6 A genética do inflamassoma no diagnóstico diferencial da EM com outras doenças neurológicas.

Por fim, levando em consideração o problema do diagnóstico diferencial nas doenças neurológicas desmielinizantes (ZHANG, 2014; PUTHENPARAMPIL, 2017), e os vários estudos apontando a contribuição do inflamassoma nas doenças autoimunes (YANG, 2015) ou neurodegenerativas (FREEMAN e TING, 2016), assim como o papel crucial do inflamassoma e dos seus receptores no SNC (ZHOU, 2016), procuramos entender se existia uma contribuição diferente dos vários genes do inflamassoma ou do complexo em si, na EM comparada as outras doenças neurológicas desmielinizantes.

Portanto comparamos a distribuição dos SNPs entre o grupo de pacientes EM (n=210) e pacientes com outras doenças neurológicas (n=55) (**Tabela 16**). Em seguida considerando que a neuromielite óptica é a doença mais comum na nossa casuística após a EM, analisamos a distribuição dos SNPs nos grupos EM e NMO (n=36).

Tabela 16. Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma na esclerose múltipla comparada com outras doenças neurológicas. São reportados resumidamente os resultados da análise multivariata da distribuição dos SNPs nos pacientes com esclerose múltipla (EM), pacientes com outro tipo de doença neurológica (ON), pacientes com neuromielite optica (NMO) em termo de valores de p ajustados por gênero, idade, idade de começo da doença (p_{aj}). Em itálico são indicados $p < 0,05$. Gene ID: identificativo do gene; SNP ID: identificativo do polimorfismo de base única;

Gene ID	SNP ID	EM vs ON	EM vs NMO
<i>NLRP1</i>	rs12150220	<i>0,028</i>	<i>0,017</i>
	rs11651270	0,629	0,562
<i>NLRP3</i>	rs10754558	0,303	0,221
	rs35829419	0,059	0,096
<i>NLRC4</i>	rs479333	0,378	0,343
<i>IL1B</i>	rs16944	0,735	0,780
<i>IL18</i>	rs1834481	0,292	0,219
	rs5744256	0,391	0,349

Apenas o genótipo polimórfico T/T da variante rs12151220 resultou mais frequente nos pacientes EM (0,63) que nos pacientes com outras doenças neurológicas (0,43) ou especificamente na NMO (0,42) de acordo com um modelo dominante de herança, porem o resultado não atingiu um valor significativo após correção pelas variáveis gênero, idade, idade de início da doença e tempo de doença ($p_{aj} = 0.017$; $OR_{aj} = 2.15$; 95% IC=1.14 - 4.06).

Essa variante corresponde a uma troca de aminoácidos (L155H) que foi relacionada a um ganho de função do receptor NLRP1 e consequentemente relacionada com uma maior ativação do complexo (LEVANDOWSKI, 2013), sugerindo que além do NLRP3 também NLRP1 poderia desempenhar um papel chave na ativação do inflamassoma na EM, como proposto previamente por FREEMAN (2016).

5.2 PARTE II – Análise funcional do inflamassoma em pacientes com EM

Uma vez que demonstramos que a genética do inflamassoma, e em particular do NLRP3 inflamassoma, pode contribuir com o desenvolvimento ou a gravidade da EM, e com o objetivo de verificar uma possível alteração periférica do inflamassoma nos pacientes com EM estabelecida, decidimos investigar a ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes, desafiados com o protocolo clássico de estimulação do NLRP3 (LPS e ATP) (GATTORNO, 2007). Avaliamos tanto a produção das citocinas IL-1 β e IL-18, assim como de uma citocina não relacionada com o inflamassoma (TNF), quanto o perfil de expressão gênica do inflamassoma.

5.2.1 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes EM

Os monócitos isolados de 9 pacientes EM e 10 indivíduos controles foram estimulados com 1 μ g/mL LPS por 3 e 24 horas e com 1 mM ATP por anteriores 15 minutos. Podemos observar que o LPS induz a produção de IL-1 β após 3 horas de estimulação tanto nos controles que nos pacientes, assim como após 24 horas de estímulo com LPS (Figura 4). Porém apenas após 3 horas a produção de IL-1 β resultou estatisticamente mais elevada no grupo de pacientes comparada com os controles ($p=0,002$). A adição do ATP aumentou significativamente a produção de IL-1 β comparada com o efeito do LPS tanto no grupo de pacientes EM (240 pg/ml) e dos controles (220 pg/ml), porém sem nenhuma diferença entre os dois grupos ($p>0,05$). Nas figuras abaixo são relatados tanto os dados de produção de IL-1 β quanto IL-18, sob as mesmas condições de estímulo e tempo (**Figura 4 e 5**).

Figura 4. Produção de IL-1 β em monócitos de pacientes com EM e indivíduos saudáveis

Concentração de IL-1 β no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com EM (n=9) e controles (n=10), estimulados com 1 μ g/mL LPS por 3 e 24 horas na presença ou menos de 1mM de ATP por 15 minutos. A análise da diferença na produção de IL-1 β entre os grupos foi executada pelo oneway ANOVA, não paramétrico pareado, p-value <0,05 foi considerado significativo.

Figura 5. Produção de IL-18 em monócitos de pacientes com EM e indivíduos saudáveis

Concentração de IL-18 no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com EM (n=9) e controles (n=10), estimulados com 1 μ g/mL LPS por 3 e 24 horas na presença ou menos de 1mM de ATP por 15 minutos. A análise da diferença na produção de IL-1 β entre os grupos foi executada pelo oneway ANOVA, não paramétrico pareado, p-value <0,05 foi considerado significativo.

Na **Figura 4** são reportados os dados de produção de TNF nas mesmas condições experimentais. Observa-se que os monócitos de pacientes com EM não mostram diferença significativa na produção desta citocina comparados com os monócitos de indivíduos controle, a nenhum dos tempos avaliados (3 e 24 horas). Além disso enfatizamos que não existe diferença significativa na produção de TNF quando o ATP é adicionado na cultura.

Figura 6. Produção de TNF em monócitos de pacientes com EM e indivíduos saudáveis,

Concentração de TNF no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes EM e indivíduos saudáveis, estimulados com 1µg/mL LPS por 3 e 24 horas na presença de 1mM de ATP por 15 minutos, A análise da diferença na produção de TNF-α entre os grupos foi executada pelo teste T, p-value <0,05 foi considerado significativo.

Em conjunto, esses resultados sugerem que monócitos de sangue periférico de pacientes EM apresentam um menor limiar de resposta do NLRP3 inflamassoma, sendo que foi suficiente um primeiro sinal (LPS) para induzir uma elevada liberação da IL-1β. Por outro lado, a resposta a adição de ATP (sinal 2 para ativação do NLRP3 inflamassoma) não parece ser afetada nos pacientes EM quando comparados com controles, sugerindo que, pelo menos a nível periférico, o NLRP3 inflamassoma está atuando de forma normal.

5.2.2 Análise do perfil de expressão genica do inflamassoma em monócitos de pacientes EM

Nos monócitos estimulados com LPS, avaliamos a modulação da expressão gênica tanto dos componentes “efetores” do inflamassoma (*CASP1*, *IL1B*, *IL18*) quanto nos receptores (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*), quando comparada com as células a repouso.

Como mostrado na **Figura 7**, o estímulo com LPS induz uma modulação positiva ($FC > 1$, $\log FC > 0$) dos genes *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* genes tanto em controles (C) quanto em pacientes EM (7 A).

Em seguida para destacar os componentes do NLRP3 inflamassoma, comparamos num gráfico de barras o valor de FC entre pacientes e controles (Fig. 5B). Nos pacientes o aumento de expressão do *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* foi maior que nos controles, e de modo significativo para *NLRP3* e *CASP1* (7 B).

Figura 7. O LPS modula a expressão dos genes do inflamassoma de forma diferente em monócitos EM e de controle

(A) Heatmap apresentados os valores de $\log FC$ relativos a expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*, *IFI16*, *CASP1*, *IL1B* e *IL18* em monócitos dos pacientes EM e de doadores saudáveis (HD) desafiados por 3 horas com LPS e comparados com as células a repouso. (B) Os dados expressos em forma de fold change, que é uma duplicação na escala original é igual a uma mudança $\log_2$ vezes de 1. GAPDH foi utilizado como gene de referência.

Em conjuntos esses dados de ensaios in vitro sugeriram que monócitos do sangue periférico de pacientes com EM são capaz de ativar corretamente o inflamassoma NLRP3 em resposta a gatilhos clássicos (LPS, ATP), mas apresentam um complexo ativo constitutivo (também suportado pelo perfil de expressão) e consequentemente produzido maior nível de IL-

1 β . Para o que diz respeito à IL-18, observamos um menor nível de produção de citocinas de monócitos em comparação com IL-1 β tanto em células MS e HD, e apenas uma tendência não significativa de aumentar em células MS após 24 horas de estimulação LPS.

5.2.3. Análise *in silico* da expressão do inflamassoma no SNC de pacientes EM

Levando em consideração os dados obtidos nos monócitos de sangue periférico, e sabendo da dificuldade de acesso a material biológico do SNC de pacientes EM, procuramos dados de expressão dos genes do inflamassoma no SNC de pacientes EM em bancos de dados públicos com objetivo de confirmar os nossos achados.

Conseguimos achar dados da expressão relativa dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *MEFV*, *CASPASE 1*, *CASPASE 4*, *CASPASE 5*, *IL1B* e *IL18* em lesões cerebrais de pacientes com EM (comparados com controles) e em lesões cerebrais de pacientes com EM precoce. Os dados foram incluídos como $-\log(\text{FC})$ em um gráfico de *heatmap*. Figura 8.

Figura 8. Expressão dos genes do inflamassoma em lesões cerebrais de pacientes com EM e de controles. Heatmap apresentados os valores de logFC relativos a expressão dos genes NLRP1, NLRP3, NLRC4, AIM2, MEFV, CASPASE 1, CASPASE 4, CASPASE 5, IL1B e IL18 em leões de cérebros dos pacientes EM e de controles saudáveis.

Esses dados mostram que os cérebros de pacientes EM possuem maior expressão de componentes do NLRP1 inflamassoma (*NLRP1*, *CASP4*, *CASP5*, *IL1B*), quando comparado com os de controles. Enquanto que a contribuição do NLRP3 inflamassoma e de outros receptores como a pirina (*MEFV*) e o mesmo NLRP1, são importantes nas fases precoces do dano neurológico.

6. DISCUSSÃO

A esclerose múltipla é uma doença que possui sua etiologia ainda desconhecida, mas com clara predisposição genética e fatores de risco ambiental (ASCHEIRO, 2013). Nos últimos anos vem se delineando uma contribuição importante do processo inflamatório na patogênese e também na progressão da EM.

Nesse contexto a ativação do inflamassoma foi apontada como um fator de risco importante para o desenvolvimento da doença. Em modelo experimental (EAE) camundongos deficientes para os componentes do NLRP3 inflamassoma não apresentam EAE ou a apresentam de forma mais branda (SHAW, 2010).

Os nossos dados corroboram tanto os resultados experimentais que aqueles obtidos em pacientes com EM: uma constitutiva ativação do inflamassoma, possivelmente o receptor NLRP3, e uma maior produção de IL-1 β e IL-18 representam tanto um fator de risco para desenvolvimento de EM, quanto para a progressão a formas graves da doença (maior EDSS e IP, formas progressivas).

Elevadas concentrações de IL-18 foram encontradas em pacientes com progressão crônica e pacientes recidivantes em remissão (HUANG 2004; KARNI 2002; LOSY 2001; NICOLETTI 2001), sugerindo que variantes genéticas que afetam a expressão de citocinas poderiam representar um fator de risco para a EM.

Analizamos dois SNPs na IL18 conhecidos por reduzir seu nível plasmático (FRAYLING, 2007; MARTINEZ-HERVAS, 2015) e, como esperado, resultaram associados à proteção contra o desenvolvimento da EM, enfatizando um papel patogênico da IL-18 na doença. Além disso, Willing e colaboradores demonstraram elegantemente que a IL-18 plasmática é responsável por ativar um subconjunto de células T CD8 + associadas à mucosa, que se infiltram no SNC e contribuem para a imunopatogênese da EM (WILLING, 2014).

Além disso polimorfismos no gene *IL18* foram anteriormente associados a outras doenças neurológicas (FELDERHOFF-MUESER, 2005; BOSSÙ, 2008), enfatizando que esta contribuição genética poderia ser específica no contexto neurológico e na inflamação neurológica.

De acordo, a variante no promotor do gene *IL1B* (-511 C>T, rs16944), e o consequente aumento de pro-IL-1 β (HALL, 2004), resultaram associados com apresentação mais grave da EM, tanto considerando os índices de gravidade (EDSS, IP) que as formas clínicas ((PP>SP>RR), mais uma vez enfatizando que a ativação do inflamassoma representaria um evento prejudicial na EM.

É interessante ressaltar que, talvez devido ao tamanho limitado de nossa coorte, e apesar de sugerir um mesmo conceito geral sobre a contribuição do inflamassoma na EM, as variantes selecionadas nos genes *IL1B* e *IL18* não associaram contemporaneamente com a suscetibilidade ou com a progressão e gravidade, levando a hipótese de que cada citocina possa contribuir de forma única (ou ter um papel mais importante) no desencadeamento de EM (via IL-18 / Th1) ou na inflamação crônica do SNC amplificando a resposta imune e dano neurológico imunomediado (IL-1 β / Th17 e macrófagos ?) (GADANI, 2015).

Considerando também que a nossa abordagem de estudo baseada em SNPs candidados não cobriu inteiramente os genes selecionados do inflamassoma, nossos resultados sugerem que uma ativação constitutiva de NLRP3, ao invés de outros receptores como NLRP1, NLRC4 ou pirina, representa um fator de risco para MS grave. É digno de nota que as mutações de ganho de função do NLRP3 em pacientes com síndrome periódica associada à NLRP3/criopirina (CAPS, OMIM 606416) foram relatadas em pacientes com EM de início precoce (SCHUH, 2015), corroborando os nossos achados.

Com relação as formas clínicas, temos o dado com o polimorfismo rs2043211 no gene CARD8, esse gene já foi alvo de estudo na EM, porém sem uma associação forte (MALHOTRA, 2015). Já tem relatos na literatura que fala sobre o CARD8 como um regulador negativo do NLRP3 fazendo com que o gene do NLRP3 perda função de produção de citocinas, que seria compreensível de entender porque alguns indivíduos não progridem na doença, uma vez que tenham os polimorfismos e esses estejam atuando na produção de citocinas (ITO, 2014; MAO, 2018).

Quando tentamos de replicar o dado de associação entre SNPs em *NLRP3* e a resposta ao tratamento com IFN reportado por Malhotra (2015), talvez pelo número amostral limitado (91 dentro de 210 pacientes), e também pela baixa frequência da variante na população mundial. O perfil de ativação do NLRP3 inflamassoma nos monócitos de pacientes EM corrobora os dados genéticos e a nossa hipótese de uma constitutiva ativação do complexo nos pacientes EM. Esses dados também estão em linha com quanto anteriormente reportado em literatura. Pacientes com esclerose múltipla apresentam níveis plasmáticos maiores de proteínas de IL-18, ASC e caspase-1 (KEANE, 2018). Malhotra e colegas observaram uma maior expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *IL1B* e *IL18* em PBMC de pacientes EM que respondiam ao tratamento com IFN β comparados a quem não estava respondendo (MALHOTRA, 2015).

Os dados de expressão em cérebro de pacientes EM obtidos em bancos públicos corrobora apenas em parte os nossos resultados referentes a monócitos periféricos, uma vez percebido que o inflamassoma NLRP3 é ativado na EM, vários pontos ainda permanecem

obscuros: o que é reconhecido pelo NLRP3 e finalmente ativado o inflamassoma? Essa ativação ocorre na periferia e também no SNC, conforme relatado por histologia cerebral autóptica (BURM, 2016), em leucócitos infiltrados, bem como em células residentes (microglia, astrócitos, oligodendrócitos, neurônios). Enquanto o gatilho inicial é desconhecido, o ataque imune contra a mielina axonal e a consequente lesão cortical originaram DAMPs que poderiam ativar a NLRP3 in situ, causando um ciclo de lesões e piora do quadro clínico, como previamente descrito como causa de neurodegeneração (RUBARTELLI, 2014).

Por fim, apesar do número limitado do grupo de pacientes com doenças neurológicas diferente de EM na nossa coorte (55 pacientes, e destes 34 com NMO), queremos destacar a associação do polimorfismo rs12150220 (L155H) no gene *NLRP1* com o desenvolvimento específico da EM. Trabalhos recentes têm demonstrado que um haplótipo contendo o rs12150220 está associado com aumento na produção de IL-1 β por PBMC (LEVANDOWSKI, 2013). Levando em consideração que polimorfismos no gene *NLRP1* já foram anteriormente associados a doença de Alzheimer (PONTILLO, 2013; KAUSHAL, 2015), e que a literatura recente reportou a associação de variantes raras no gene *NLRP1* e EM familiar com início precoce (MAVER, 2017), um efeito de susceptibilidade era esperado para esse gene na análise caso/controle de EM, porém não ocorreu. Como mencionado acima, não podemos excluir que outros polimorfismos no gene *NLRP1*, diferentes daqueles selecionados para este trabalho, possam estar associados com EM. Do outro lado, a maior frequência da variante L155H nos pacientes EM comparados com o grupo NMO, sugeri um mecanismo inflamatório patogênico distinto entre as duas doenças, e com possível papel do NLRP1 específico para EM.

Concluindo, os resultados aqui apresentados sugerem que a ativação do NLRP3 inflamassoma represente um fator de risco tanto para desenvolvimento de EM, quanto para a progressão a formas graves da doença. Uma contribuição de outros receptores como NLRP1 e NLRC4 deverá ser levada em conta em estudos futuros.

7. REFERÊNCIAS

- ALPAYCI, M. The possible underlying pathophysiological mechanisms for development of multiple sclerosis in familial Mediterranean fever. *Med Hypotheses*, v. 78, n. 6, p. 717-20, Jun 2012. ISSN 1532-2777 (Electronic) 0306-9877 (Linking).
- BALASHOV, K. E. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 96, n. 12, p. 6873-8, Jun 8 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).
- BARANZINI, S. E. The genetics of autoimmune diseases: a networked perspective. *Curr Opin Immunol*, v. 21, n. 6, p. 596-605, Dec 2009. ISSN 1879-0372 (Electronic) 0952-7915 (Linking).
- BLASCHEK, A. TNFRSF1A and MEFV mutations in childhood onset multiple sclerosis. *Eur J Paediatr Neurol*, v. 22, n. 1, p. 72-81, Jan 2018. ISSN 1532-2130 (Electronic) 1090-3798 (Linking).
- BOIOCCHI, C. Heat shock protein 70-hom gene polymorphism and protein expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, v. 298, p. 189-93, Sep 15 2016. ISSN 1872-8421 (Electronic) 0165-5728 (Linking).
- COLL, R. C. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*, v. 21, n. 3, p. 248-55, Mar 2015. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking).
- COMPSTON, A.; COLES, A. Multiple sclerosis. *Lancet*, v. 359, n. 9313, p. 1221-31, Apr 6 2002. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).
- _____. Multiple sclerosis. *Lancet*, v. 372, n. 9648, p. 1502-17, Oct 25 2008. ISSN 1474-547X (Electronic) 0140-6736 (Linking).
- CORREALE, J.; DE LOS MILAGROS BASSANI MOLINAS, M. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol*, v. 249, n. 4, p. 375-89, Apr 2002. ISSN 0340-5354 (Print) 0340-5354 (Linking).
- DARDIOTIS, E. Gene variants of adhesion molecules act as modifiers of disease severity in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, v. 4, n. 4, p. e350, Jul 2017. ISSN 2332-7812 (Print) 2332-7812 (Linking).
- DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*, v. 15, n. 9, p. 545-58, Sep 15 2015. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking).
- DHIB-JALBUT, S.; MARKS, S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 74 Suppl 1, p. S17-24, Jan 5 2010. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).
- DINARELLO, C. A. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol*, v. 103, n. 1 Pt 1, p. 11-24, Jan 1999. ISSN 0091-6749 (Print) 0091-6749 (Linking).

DISANTO, G.; MORAHAN, J. M.; RAMAGOPALAN, S. V. Multiple sclerosis: risk factors and their interactions. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, v. 11, n. 5, p. 545-55, Aug 2012. ISSN 1996-3181 (Electronic) 1871-5273 (Linking).

DUHEN, T.; CAMPBELL, D. J. IL-1beta promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *J Immunol*, v. 193, n. 1, p. 120-9, Jul 1 2014. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).

DUTTA, R.; TRAPP, B. D. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol*, v. 27, n. 3, p. 271-8, Jun 2014. ISSN 1473-6551 (Electronic) 1350-7540 (Linking).

EBADI, N. The spectrum of Familial Mediterranean Fever gene (MEFV) mutations and genotypes in Iran, and report of a novel missense variant (R204H). *Eur J Med Genet*, v. 60, n. 12, p. 701-705, Dec 2017. ISSN 1878-0849 (Electronic) 1769-7212 (Linking).

EBERS, G. C.; SADOVNICK, A. D.; RISCH, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*, v. 377, n. 6545, p. 150-1, Sep 14 1995. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking).

EIKELENBOOM, M. J. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology*, v. 60, n. 2, p. 219-23, Jan 28 2003. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking).

ELLIDAG, H. Y. Comparison of neurophysiological and MRI findings of patients with multiple sclerosis using oligoclonal band technique. *Ann Neurosci*, v. 20, n. 4, p. 149-54, Oct 2013. ISSN 0972-7531 (Print) 0972-7531 (Linking).

FLETCHER, J. M. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*, v. 162, n. 1, p. 1-11, Oct 2010. ISSN 1365-2249 (Electronic) 0009-9104 (Linking).

FREEMAN, L. C.; TING, J. P. The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, v. 136 Suppl 1, p. 29-38, Jan 2016. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking).

FURLAN, R. Peripheral levels of caspase-1 mRNA correlate with disease activity in patients with multiple sclerosis; a preliminary study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 67, n. 6, p. 785-8, Dec 1999. ISSN 0022-3050 (Print) 0022-3050 (Linking).

GATTORNO, M. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. *Arthritis Rheum*, v. 56, n. 9, p. 3138-48, Sep 2007. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591 (Linking).

GELFAND, J. M. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handb Clin Neurol*, v. 122, p. 269-90, 2014. ISSN 0072-9752 (Print) 0072-9752 (Linking).

GRAVES, J. S. The multiple sclerosis risk allele within the AHI1 gene is associated with relapses in children and adults. *Mult Scler Relat Disord*, v. 19, p. 161-165, Jan 2018. ISSN 2211-0356 (Electronic) 2211-0348 (Linking).

GRIGORIADIS, N.; VAN PESCH, V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol*, v. 22 Suppl 2, p. 3-13, Oct 2015. ISSN 1468-1331 (Electronic) 1351-5101 (Linking).

GRIS, D. NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses. *J Immunol*, v. 185, n. 2, p. 974-81, Jul 15 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).

GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*, v. 21, n. 7, p. 677-87, Jul 2015. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking).

GUTIERREZ-ARCELUS, M.; RICH, S. S.; RAYCHAUDHURI, S. Autoimmune diseases - connecting risk alleles with molecular traits of the immune system. *Nat Rev Genet*, v. 17, n. 3, p. 160-74, Mar 2016. ISSN 1471-0064 (Electronic) 1471-0056 (Linking).

HAFLER, D. A. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med*, v. 357, n. 9, p. 851-62, Aug 30 2007. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

HARBO, H. F.; GOLD, R.; TINTORE, M. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*, v. 6, n. 4, p. 237-48, Jul 2013. ISSN 1756-2856 (Print) 1756-2856 (Linking).

HARMS, R. Z. Altered CD161 bright CD8+ mucosal associated invariant T (MAIT)-like cell dynamics and increased differentiation states among juvenile type 1 diabetics. *PLoS One*, v. 10, n. 1, p. e0117335, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

HARRISON, O. J. Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3(+) Treg cell function in the intestine. *Mucosal Immunol*, v. 8, n. 6, p. 1226-36, Nov 2015. ISSN 1935-3456 (Electronic) 1933-0219 (Linking).

HEMMER, B.; ARCHELOS, J. J.; HARTUNG, H. P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci*, v. 3, n. 4, p. 291-301, Apr 2002. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003X (Linking).

HERNANDEZ-PEDRO, N. Y. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol*, v. 2013, p. 413465, 2013. ISSN 1740-2530 (Electronic) 1740-2522 (Linking).

HOFFMAN, H. M.; BRODERICK, L. The role of the inflammasome in patients with autoinflammatory diseases. *J Allergy Clin Immunol*, v. 138, n. 1, p. 3-14, Jul 2016. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking).

HOLLENBACH, J. A.; OKSENBERG, J. R. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun*, v. 64, p. 13-25, Nov 2015. ISSN 1095-9157 (Electronic) 0896-8411 (Linking).

HOLLENBACH, J. A. The killer immunoglobulin-like receptor KIR3DL1 in combination with HLA-Bw4 is protective against multiple sclerosis in African Americans. *Genes Immun*, v. 17, n. 3, p. 199-202, Apr 2016. ISSN 1476-5470 (Electronic) 1466-4879 (Linking).

IFUKU, M. Induction of interleukin-1beta by activated microglia is a prerequisite for immunologically induced fatigue. *Eur J Neurosci*, v. 40, n. 8, p. 3253-63, Oct 2014. ISSN 1460-9568 (Electronic) 0953-816X (Linking).

INOUE, M.; SHINOHARA, M. L. NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis*, v. 2013, p. 859145, 2013. ISSN 2090-0422 (Print) 2090-0430 (Linking).

INOUE, M. Interferon-beta therapy against EAE is effective only when development of the disease depends on the NLRP3 inflammasome. *Sci Signal*, v. 5, n. 225, p. ra38, May 22 2012. ISSN 1937-9145 (Electronic) 1945-0877 (Linking).

ISIK, N. Multiple sclerosis: association with the interleukin-1 gene family polymorphisms in the Turkish population. *Int J Neurosci*, v. 123, n. 10, p. 711-8, Oct 2013. ISSN 1563-5279 (Electronic) 0020-7454 (Linking).

JERSILD, C. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet*, v. 2, n. 7840, p. 1221-5, Dec 1 1973. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736 (Linking).

JOKUBAITIS, V. G. Genotype and Phenotype in Multiple Sclerosis-Potential for Disease Course Prediction? *Curr Treat Options Neurol*, v. 20, n. 6, p. 18, Apr 24 2018. ISSN 1092-8480 (Print) 1092-8480 (Linking).

KARAKAS CELIK, S. Interleukin 18 gene polymorphism is a risk factor for multiple sclerosis. *Mol Biol Rep*, v. 41, n. 3, p. 1653-8, Mar 2014. ISSN 1573-4978 (Electronic) 0301-4851 (Linking).

KARNI, A. IL-18 is linked to raised IFN-gamma in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J Neuroimmunol*, v. 125, n. 1-2, p. 134-40, Apr 2002. ISSN 0165-5728 (Print) 0165-5728 (Linking).

KIM, H. K. Nod-like receptor pyrin containing 3 (NLRP3) in the post-mortem frontal cortex from patients with bipolar disorder: A potential mediator between mitochondria and immune-activation. *J Psychiatr Res*, v. 72, p. 43-50, Jan 2016. ISSN 1879-1379 (Electronic) 0022-3956 (Linking).

KISTER, I. Natural history of multiple sclerosis symptoms. *Int J MS Care*, v. 15, n. 3, p. 146-58, Fall 2013. ISSN 1537-2073 (Print) 1537-2073 (Linking).

KUERTEN, S.; LEHMANN, P. V. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *J Interferon Cytokine Res*, v. 31, n. 12, p. 907-16, Dec 2011. ISSN 1557-7465 (Electronic)

1079-9907 (Linking).

KUMAR, D. R. Jean-Martin Charcot: the father of neurology. Clin Med Res, v. 9, n. 1, p. 46-9, Mar 2011. ISSN 1554-6179 (Electronic)
1539-4182 (Linking).

KURTZKE, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology, v. 33, n. 11, p. 1444-52, Nov 1983. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking).

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell, v. 157, n. 5, p. 1013-22, May 22 2014. ISSN 1097-4172 (Electronic)
0092-8674 (Linking).

LANDTBLUM, A. M. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848). Neurol Sci, v. 31, n. 1, p. 29-33, Feb 2010. ISSN 1590-3478 (Electronic)
1590-1874 (Linking).

LASIGLIE, D. Role of IL-1 beta in the development of human T(H)17 cells: lesson from NLRP3 mutated patients. PLoS One, v. 6, n. 5, p. e20014, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking).

LATZ, E.; XIAO, T. S.; STUTZ, A. Activation and regulation of the inflammasomes. Nat Rev Immunol, v. 13, n. 6, p. 397-411, Jun 2013. ISSN 1474-1741 (Electronic)
1474-1733 (Linking).

LIN, R. The genetics of multiple sclerosis. Pract Neurol, v. 12, n. 5, p. 279-88, Oct 2012. ISSN 1474-7766 (Electronic)
1474-7758 (Linking).

LOSY, J.; NIEZGODA, A. IL-18 in patients with multiple sclerosis. Acta Neurol Scand, v. 104, n. 3, p. 171-3, Sep 2001. ISSN 0001-6314 (Print)
0001-6314 (Linking).

LUBLIN, F. D. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology, v. 83, n. 3, p. 278-86, Jul 15 2014. ISSN 1526-632X (Electronic)
0028-3878 (Linking).

MANN, C. L. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. J Neuroimmunol, v. 129, n. 1-2, p. 197-204, Aug 2002. ISSN 0165-5728 (Print)
0165-5728 (Linking).

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. Mol Cell, v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002. ISSN 1097-2765 (Print)
1097-2765 (Linking).

MATTHEWS, W. B. Paroxysmal symptoms in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v. 38, n. 6, p. 617-23, Jun 1975. ISSN 0022-3050 (Print)
0022-3050 (Linking).

MAVER, A. Identification of rare genetic variation of NLRP1 gene in familial multiple sclerosis. Sci Rep, v. 7, n. 1, p. 3715, Jun 16 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic)
2045-2322 (Linking).

MCDONALD, W. I. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*, v. 50, n. 1, p. 121-7, Jul 2001. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking).

MEDAER, R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand*, v. 60, n. 3, p. 189-92, Sep 1979. ISSN 0001-6314 (Print)
0001-6314 (Linking).

MENG, X. F. Inhibition of the NLRP3 inflammasome provides neuroprotection in rats following amygdala kindling-induced status epilepticus. *J Neuroinflammation*, v. 11, p. 212, Dec 17 2014. ISSN 1742-2094 (Electronic)
1742-2094 (Linking).

MILO, R.; MILLER, A. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, v. 13, n. 4-5, p. 518-24, Apr-May 2014. ISSN 1873-0183 (Electronic)
1568-9972 (Linking).

MOUSSIANNAS, L. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*, v. 47, n. 10, p. 1107-1113, Oct 2015. ISSN 1546-1718 (Electronic)
1061-4036 (Linking).

MURPHY, A. C. Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun*, v. 24, n. 4, p. 641-51, May 2010. ISSN 1090-2139 (Electronic)
0889-1591 (Linking).

NAITO, S. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens*, v. 2, n. 1, p. 1-4, 1972. ISSN 0001-2815 (Print)
0001-2815 (Linking).

NIELSEN, N. M. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol*, v. 162, n. 8, p. 774-8, Oct 15 2005. ISSN 0002-9262 (Print)
0002-9262 (Linking).

O'GORMAN, C.; LUCAS, R.; TAYLOR, B. Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms. *Int J Mol Sci*, v. 13, n. 9, p. 11718-52, 2012. ISSN 1422-0067 (Electronic)
1422-0067 (Linking).

ORHAN, G. The association of IL-18 gene promoter polymorphisms and the levels of serum IL-18 on the risk of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*, v. 146, p. 96-101, Jul 2016. ISSN 1872-6968 (Electronic)
0303-8467 (Linking).

ORRU, V. Genetic variants regulating immune cell levels in health and disease. *Cell*, v. 155, n. 1, p. 242-56, Sep 26 2013. ISSN 1097-4172 (Electronic)
0092-8674 (Linking).

OTA, M. Abnormalities of cerebral blood flow in multiple sclerosis: a pseudocontinuous arterial spin labeling MRI study. *Magn Reson Imaging*, v. 31, n. 6, p. 990-5, Jul 2013. ISSN 1873-5894 (Electronic)
0730-725X (Linking).

PATEL, M. N. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. *Trends Mol Med*, v. 23, n. 2, p. 165-180, Feb 2017. ISSN 1471-499X (Electronic)

1471-4914 (Linking).

PATSOPOULOS, N. The Multiple Sclerosis Genomic Map: Role of peripheral immune cells and resident microglia in susceptibility. *bioRxiv*, 2017. Disponível em: <
<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/07/13/143933.full.pdf> >.

PATSOPOULOS, N. A. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet*, v. 9, n. 11, p. e1003926, Nov 2013. ISSN 1553-7404 (Electronic)
1553-7390 (Linking).

PAWLAK-ADAMSKA, E. PD-1 gene polymorphic variation is linked with first symptom of disease and severity of relapsing-remitting form of MS. *J Neuroimmunol*, v. 305, p. 115-127, Apr 15 2017. ISSN 1872-8421 (Electronic)
0165-5728 (Linking).

PELLEGRINI, C. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Front Immunol*, v. 8, p. 36, 2017. ISSN 1664-3224 (Print)
1664-3224 (Linking).

PEPPING, M.; EHDE, D. M. Neuropsychological evaluation and treatment of multiple sclerosis: the importance of a neuro-rehabilitation focus. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, v. 16, n. 2, p. 411-36, viii, May 2005. ISSN 1047-9651 (Print)
1047-9651 (Linking).

PIRTTILA, T.; NURMIKKO, T. CSF oligoclonal bands, MRI, and the diagnosis of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*, v. 92, n. 6, p. 468-71, Dec 1995. ISSN 0001-6314 (Print)
0001-6314 (Linking).

PONTILLO, A. Inflammasome polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, v. 48, n. 7, p. 434-7, 2015. ISSN 1607-842X (Electronic)
0891-6934 (Linking).

POSER, C. M. The dissemination of multiple sclerosis: a Viking saga? A historical essay. *Ann Neurol*, v. 36 Suppl 2, p. S231-43, Dec 1994. ISSN 0364-5134 (Print)
0364-5134 (Linking).

PRINZ, M.; PRILLER, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci*, v. 20, n. 2, p. 136-144, Feb 2017. ISSN 1546-1726 (Electronic)
1097-6256 (Linking).

PUJOL, J. Lesions in the left arcuate fasciculus region and depressive symptoms in multiple sclerosis. *Neurology*, v. 49, n. 4, p. 1105-10, Oct 1997. ISSN 0028-3878 (Print)
0028-3878 (Linking).

PUTHENPARAMPIL, M. Trans-synaptic degeneration in the optic pathway. A study in clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis with or without optic neuritis. *PLoS One*, v. 12, n. 8, p. e0183957, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic)
1932-6203 (Linking).

QURESHI, M. PLXNA3 Variant rs5945430 is Associated with Severe Clinical Course in Male Multiple Sclerosis Patients. *Neuromolecular Med*, v. 19, n. 2-3, p. 286-292, Sep 2017. ISSN 1559-1174 (Electronic)
1535-1084 (Linking).

REJDAK, K.; JACKSON, S.; GIOVANNONI, G. Multiple sclerosis: a practical overview for clinicians. *Br Med Bull*, v. 95, p. 79-104, 2010. ISSN 1471-8391 (Electronic) 0007-1420 (Linking).

ROSATI, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*, v. 22, n. 2, p. 117-39, Apr 2001. ISSN 1590-1874 (Print) 1590-1874 (Linking).

SAMA, M. A. Interleukin-1beta-dependent signaling between astrocytes and neurons depends critically on astrocytic calcineurin/NFAT activity. *J Biol Chem*, v. 283, n. 32, p. 21953-64, Aug 8 2008. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking).

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protocols*, v. 3, n. 6, p. 1101-1108, 06//print 2008. ISSN 1754-2189. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>>.

SCHUH, E. Multiple sclerosis-like lesions and type I interferon signature in a patient with RVCL. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, v. 2, n. 1, p. e55, Feb 2015. ISSN 2332-7812 (Print) 2332-7812 (Linking).

SHAFTEL, S. S.; GRIFFIN, W. S.; O'BANION, M. K. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*, v. 5, p. 7, Feb 26 2008. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking).

SHAW, M. H. Microbiota-induced IL-1beta, but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J Exp Med*, v. 209, n. 2, p. 251-8, Feb 13 2012. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking).

SRIRAMOJU, B.; KANWAR, R. K.; KANWAR, J. R. Neurobehavioral burden of multiple sclerosis with nanotheranostics. *Neuropsychiatr Dis Treat*, v. 11, p. 2675-89, 2015. ISSN 1176-6328 (Print) 1176-6328 (Linking).

TAN, C. C. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. *J Neuroinflammation*, v. 12, p. 18, Jan 28 2015. ISSN 1742-2094 (Electronic) 1742-2094 (Linking).

TAN, S. Y.; SHIGAKI, D. Jean-Martin Charcot (1825-1893): pathologist who shaped modern neurology. *Singapore Med J*, v. 48, n. 5, p. 383-4, May 2007. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675 (Linking).

THORBURN, A. L. Jean Martin Charcot, 1825-1893. An appreciation. *Br J Vener Dis*, v. 43, n. 2, p. 77-80, Jun 1967. ISSN 0007-134X (Print) 0007-134X (Linking).

WILLER, C. J. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 100, n. 22, p. 12877-82, Oct 28 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).

YIN, Y. Inflammasomes are differentially expressed in cardiovascular and other tissues. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 22, n. 2, p. 311-22, Apr-Jun 2009. ISSN 0394-6320 (Print)

0394-6320 (Linking).

YONG, H.; CHARTIER, G.; QUANDT, J. Modulating inflammation and neuroprotection in multiple sclerosis. *J Neurosci Res*, Jun 5 2017. ISSN 1097-4547 (Electronic) 0360-4012 (Linking).

ZHANG, L. Comparison of deep gray matter lesions on magnetic resonance imaging among adults with acute disseminated encephalomyelitis, multiple sclerosis, and neuromyelitis optica. *Mult Scler*, v. 20, n. 4, p. 418-23, Apr 2014. ISSN 1477-0970 (Electronic) 1352-4585 (Linking).

ZHOU, F. Deep sequencing of the MHC region in the Chinese population contributes to studies of complex disease. *Nature Genetics*, v. 48, p. 740, 05/23/online 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3576>>.

ZHOU, Y. Genetic variation in the gene LRP2 increases relapse risk in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 88, n. 10, p. 864-868, Oct 2017. ISSN 1468-330X (Electronic) 0022-3050 (Linking).

ZHOU, Y. Variation within MBP gene predicts disease course in multiple sclerosis. *Brain Behav*, v. 7, n. 4, p. e00670, Apr 2017. ISSN 2162-3279 (Electronic).

ZINDLER, E.; ZIPP, F. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, v. 24, n. 4, p. 551-62, Dec 2010. ISSN 1878-1608 (Electronic) 1521-6896 (Linking).

SCHMITTGEN, TD.; LIVAK, KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, v.2008, p. 1101 – 1108, 2008. ISSN 1750-2799 (online). 1750-2799 (Linking).

PONTILLO, A; et al. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection in HIV-positive patients is associated with CARD8 genetic variant. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. v. 2013, p. 147-151, 2013. ISSN 1525-4135 (Print). 1944-7884 (Linking).

KAUSHAL, V; et al. Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. *Cell Death Differ*, v.2015, p. 1676 -1686, 2015. ISSN 1476-5403. 1350-9047 (Linking).

PONTILLO, A; et al. NALP1/NLRP1 genetic variants are associated with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, v 2012, p. 277- 281, 2012. ISSN 1546-4156 (Print). 0893-0341 (Linking).

MALHOTRA, S; et al. NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN- β in patients with multiple sclerosis. *Brain*, v. 2015, p. 644 – 652, 2015. ISSN 1460-2156 (Electronic). 0006-8950 (Linking).

FRAYLING, TM; et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, v. 2007, p. 889-894, 2007. ISSN 1095-9203 (Electronic).

HITOMI, Y; et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*, v. 2009, p. 779 – 785, 2009. ISSN 1097-6825 (Electronic). 0091-6749 (Linking).

VERMA, D; et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. PLoS One, v. 2012, p. e34977, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic). 1932-6203 (Linking).

ZELLER, T; et al. Molecular characterization of the NLRC4 expression in relation to Interleukin-18 levels. Circ Cardiovasc Genet, v. 2015, p. 717–726, 2015. ISSN 1942-3268 (Electronic). 1942-3268 (Linking).

MATTEINI, AM; et al. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1ra in older adults. Cytokine, v. 2014, p. 10–16, 2014. ISSN 1096-0023 (Electronic). 1043-4666 (Linking).

HALL, SK; et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. Arthritis Rheum, v. 2004, p. 1976–1983, 2004. ISSN 0004-3591 (Print). 0004-3591 (Linking).

HE, M; et al. Genome-wide association study identifies variants at the IL18-BCO2 locus associated with interleukin-18 levels. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 2010, p. 885–890, 2010. ISSN 1524-4636 (Electronic). 1079-5642 (Linking).

FREIESLEBEN, S; et al. Analysis of microRNA and Gene Expression Profiles in Multiple Sclerosis: Integrating Interaction Data to Uncover Regulatory Mechanisms. Sci Rep, v. 2016, p. 34512, 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic). 2045-2322 (Linking).

MARTINEZ-HERVAS, S; et al. Plasma IL-18 levels are related to insulin and are modulated by IL-18 gene polymorphisms. Clin Invest Arterioscler, v. 2015, p. 265-271, 2015. ISSN 1578-1879 (Electronic). 0214-9168 (Linking).

SHAW, PJ; et al. *Cutting edge: critical role for PYCARD/ASC in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J. Immunol, v. 2010, p. 4610–4614, 2010. ISSN 1550-6606 (Electronic). 0022-1767 (Linking).

SCHUH, E; et al. Expanding spectrum of neurologic manifestations in patients with NLRP3 low-penetrance mutations. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, v. 2015, p. e109., 2015. ISSN 2332-7812 (Print). 2332-7812 (Linking).

POSER, S; BAUER, HJ E POSER, W. Prognosis of multiple sclerosis -- Results from an epidemiological area in Germany. Acta Neurol. Scand., v. 1982, p. 347-354, 1982. ISSN 0001-6314 (Print). 0001-6314 (Linking).

YANG, CA e CHIANG, BL. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review. J Autoimmun, v. 2015, p. 1-8, 2015. ISSN 1095-9157 (Electronic). 0896-8411 (Linking).

ZHOU, K; et al. Recent Advances of the NLRP3 Inflammasome in Central Nervous System Disorders. J Immunol Res, v. 2016, p. 9238290, 2016. ISSN 2314-7156 (Electronic). 2314-7156 (Linking).

LEVANDOWSKI, CB; et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1beta processing via the NLRP1 inflammasome. Proc Natl Acad Sci USA, v. 2013, p. 2952–2956, 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic). 0027-8424 (Linking).

ITO, S; HARA, Y; KUBOTA, T. CARD8 is a negative regulator for NLRP3 inflammasome, but mutant NLRP3 in cryopyrin-associated periodic syndromes escapes the restriction. Arthritis Res Ther 2014; 16: R52.

HUANG, J; et al. Association of interleukin1 gene polymorphisms with multiple sclerosis: a meta-analysis. *Inflamm Res* 2013;62:97–106.

KARNI, A; et al. IL-18 is linked to raised IFN- γ in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J Neuroimmunol* 2002; 125: 134.

NICOLETTI, F; et al. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57: 342.

LOS, J; NIEZGODA, A. IL-18 in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2001; 104: 171.

WILLING, A; et al. CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 2014;44:3119–3128.

FELDERHOFF-MUESER U, et al. IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration? *Trends Neurosci*. 2005;28:487–493.

BOSSU, P; et al. Interleukin-18 produced by peripheral blood cells is increased in Alzheimer's disease and correlates with cognitive impairment. *Brain Behav Immun*, v. 2008, p. 487-492, 2008. ISSN 1090-2139 (Electronic). 0889-1591 (Linking).

ASCHERIO, A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*, v. 2013, p. 3-9, 2013. ISSN 1744-8360 (Electronic). 1473-7175 (Linking).

GADANI, SP & KIPNIS, J. Brainless immunity no more. *Nature Immunology*, v. 2015, p. 440–441.
MAO, L; et al. Loss-of-function CARD8 mutation causes NLRP3 inflammasome activation and Crohn's disease. *J Clin Invest*, v. 2018, p. 1793-1806.

KEANE, RW; DIETRICH, WD; DE RIVERO-VACCARI, JP. Inflammasome proteins as biomarkers of multiple sclerosis. *Front Neurol*, v. 2018, p. 135.

BURM, SM; et al. Expression of IL-1 β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *J. Neuroinflammation*, v, 2016, p. 138.

8. ANEXOS

Variants in *NLRP3* and *NLRC4* inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis

Jaine LS Soares^a, Enedina ML Oliveira^b, Alessandra Pontillo^{a,*}

^a Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Universidade de São Paulo (USP). Avenida Professor Lineu Prestes 1730, São Paulo, Brazil

^b Ambulatório de Doenças Desmielinizantes, Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Rua Pedro de Toledo 650, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Multiple sclerosis
Inflammasome
Genetics
NLRP3
NLRC4
IL-1 β
IL-18

ABSTRACT

Background: Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease of central nervous system (CNS) with autoimmune and inflammatory characteristics, and a still uncertain pathogenesis. Early events as well as evolution of MS are heterogeneous (three main clinical forms) and multifactorial. Genome-wide association studies indicate that MS pathogenesis shares features with both autoimmune and inflammatory diseases. Innate immunity has been recently proved to be an important factor in MS. Genetic variants in inflammasome components have been associated with both autoimmune and neurodegenerative diseases, letting us hypothesize that inflammasome, and related cytokines IL-1 β and IL-18, could represent important contributors in MS pathogenesis, and eventually explain, at least in part, the heterogeneity observed in MS patients.

Aim: To evaluate the contribution of inflammasome in MS, in term of (a) genetic effect on development, severity and/or prognosis, and (b) complex activation in peripheral blood as a measure of systemic inflammation.

Methods: Functional genetic variants in inflammasome components were analyzed in a cohort of MS patients, by the use of allele-specific assays and qPCR. Multivariate analysis was performed based on clinical form (recurrent remittent/RR, primary progressive/PP or secondary progressive/SP), severity index (EDSS) and progression index (PI), response to IFN- β treatment. Peripheral blood monocytes (PBM) of patients were examined for inflammasome activation and expression profile.

Results and discussion: Variants associated with low serum levels of IL-18 were significantly less frequent in MS patients than in controls, suggesting a protective role of diminished IL-18-mediate inflammation in MS development. On the other hands, gain-of-function variants in *NLRP3* (Q705K) and *IL1B* (-511 C > T) associated with severity and progression of MS, suggesting that a constitutive activation of *NLRP3* inflammasome could represent a risk factor for MS clinical presentation. Accordingly, -511C > T SNP resulted more frequent in progressive forms than in RR MS, reinforcing the idea that increased inflammasome activation characterized bad prognosis of MS. Altogether these findings corroborate previous data about the harmful role of *NLRP3* inflammasome in experimental autoimmune encephalitis (EAE). Moreover, we reported for the first time the beneficial effect of *NLRC4* rs479333 G > C variant in MS progression and in the response to IFN- β treatment. This intronic polymorphism have been previously associated to decreased *NLRC4* transcription and low IL-18 serum level, indicated once more that less activation of inflammasome and IL-18 production are beneficial for MS patients.

PBM analysis showed that MS cells express higher level of inflammasome genes than HD ones, and are more prone to respond to a classical *NLRP3* stimulus than HD.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neurodegenerative disease of central nervous system (CNS) with both autoimmune and inflammatory characteristics. It affects more than 2 million individuals worldwide,

typically young people (30–40 years old) and prominently women (women/men: 2/1) (Hauser, 2006; Harbo et al., 2013; Compston, 2008; Annapurma, 2002). Although the exact cause of MS still remains obscure, its pathogenesis is considered a result of interactions between genetic, infectious (i.e. Epstein Barr Virus/EBV) or other environmental

* Corresponding author.

E-mail address: alepontillo@usp.br (A. Pontillo).

<https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.01.023>

Received 28 August 2018; Received in revised form 8 January 2019; Accepted 10 January 2019

2211-0348/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

factors, which lead to the loss of immune self-tolerance, and to the consequent CNS infiltration of peripheral blood mononuclear cells activated toward myelin and neurons components. Progressive myelin loss and local inflammation determine the neurologic dysfunction and the neurodegeneration (Hauser, 2006; Compston, 2008).

Early events as well as evolution of MS are heterogeneous, making both diagnosis and prognosis a difficult matter. Magnetic resonance imaging (MRI), spinal fluid analysis, and/or evoked potential recordings are sensitive tests for MS but they are not specific. Other inflammatory demyelinating diseases, such as optic neuritis, neuromyelitis optica (NMO), idiopathic transverse myelitis, acute encephalomyelitis, Marburg disease, and metabolic diseases (i.e., adrenoleukodystrophy and metachromatic leukodystrophy) or infectious disease (i.e. HTLV-1, Lyme disease) could be confused with MS (Scolding, 2001).

About 85% of patients present a biphasic disease course, with a first phase of episodes of neurologic disability and benign periods (relapsing-remitting/RR MS), and a second one, occurring in 90% of RR-MS patients, of neurological decline (secondary progressive/SP MS). A rarer clinical presentation (about 10% of total patients) is characterized by a steady neurodegeneration without any recovery (primary progressive/PP MS) (Noseworthy, 1999 and 2000; Hauser, 2006; Trapp, 2008).

Genetic contribution in MS is strongly supported by epidemiologic studies in distinct ancestral groups (Caucasian versus African and Asian), and by family-based analysis (MS patients tend to cluster in families) (widely revised in Baranzini, 2017). The first locus to be associated to MS was the HLA region (6p21), and nowadays more than 200 susceptibility variants were reported in genome wide association studies (GWAS) and candidate-gene studies. As expected, several variants affect immune system genes, and, of note, are shared with other autoimmune diseases, such as type 1 diabetes (T1D) and systemic lupus erythematosus (SLE) (Baranzini, 2017). Moreover, several associated variants resulted to be expression quantitative trait loci (eQTL) in immune cells, such as T CD4+ lymphocytes and monocytes, suggesting the involvement of both adaptive and innate immune system dysregulation in MS (Baranzini, 2017).

Clinical studies recently showed an increased expression of proinflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 in MS patients according to their presentation and severity (Balashov et al., 1999; Losy, 2001; Shibatomi et al., 2001; Karni et al., 2002; Mann et al., 2002). IL-1 β , besides inducing the proliferation of macrophages and other neuroinflammatory cells (i.e., microglia, astrocytes) within CNS (Perry, 2013), mediates the differentiation of naïve T CD4+ cells into Th17 subset (Sato et al., 2011; Shaw et al., 2010), while IL-18, together with IL-12, induces a Th1 polarization (Shaw et al., 2010). Both Th17 and Th1 have been implicated in the pathogenesis of MS in an experimental model of the disease (Constantinescu et al., 2011).

IL-1 β and IL-18 are released by monocytes and other cells after the cleavage of their inactive pro-forms by the caspase-1, which is activated within a cytosolic high molecular complex named inflammasome (Martinon et al., 2002). Upon sensing pathogen-associated or damage-associated molecular patterns (PAMPs or DAMPs, respectively), several cytoplasmic innate immune receptors, such as *NLRP1*, *NLRP3*, or *NLRP4*, are able to mount an inflammasome and to mediate the cleavage of the pro-caspase-1 into mature and active form caspase-1. The specificity of each inflammasome receptor has yet to be fully understood. Some receptors, such as NAIP and NLRP4, have been shown to activate the complex in response to bacterial flagellin; while several PAMPs and DAMPs through cytosolic modifications such as ATP-dependent K⁺ efflux, mitochondrial damage and consequent release of reactive oxygen species (ROS) and mtDNA, or cathepsins release from damaged lysosomes, activate *NLRP3*. Proteasome disturbing have been hypothesized to stimulate *NLRP1* (Lamkanfi, 2014).

In murine model of MS, the absence of *NLRP3* inflammasome components have been shown to protect against the demyelination and

the development of experimental autoimmune encephalitis (EAE) (Furlan et al., 1999; Shaw et al., 2010; Lalor et al., 2011), strongly indicating the contribution of this inflammasome in the pathogenesis of EAE, even if the trigger for *NLRP3* activation is still debated.

In humans, patients carrying gain-of-function mutations in *NLRP3* showed a high comorbidity with MS (Schuh et al., 2015), once more suggesting that an increased activation of *NLRP3* inflammasome could contribute to MS pathogenesis. Other inflammasome-forming receptors may play a role in MS, including *NLRP1*, as suggested by recent literature about the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in these molecules and familiar form of MS (Alpayci et al., 2012). Moreover, variants in genes coding for IL-1 β and IL-18 also have been found to associate with MS, even if often with discordant findings (Isik et al., 2013; Orhan et al., 2016).

Aim of the current study has been the evaluation of the contribution of inflammasome variants in MS development, severity and/or prognosis in a 10-year longitudinal cohort of Brazilian patients.

Taking in account the difficulty in diagnosis and prognosis, we therefore evaluated the inflammasome profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of a subset of MS patients, trying to define novel clinical markers.

2. Patients and methods

2.1. Patients

264 unrelated patients with demyelinating neurologic disorders proceeding from metropolitan geographical area of Sao Paulo (Southeast of Brazil) were recruited at the Ambulatory for demyelinating diseases (“Ambulatório de Doenças Desmielinizantes”) of Federal University of Sao Paulo State (UNIFESP) (Sao Paulo, SP, Brazil) between 2006 and 2017, in compliance with the Institutional Ethics Committee. 209 patients received a diagnosis of MS, while 55 of other neurologic diseases (more commonly neuromyelitis optica/NMO, n = 36). MS patients were classified in three main clinical forms (RR, n = 118; SP, n = 59; PP, n = 32) according to revised McDonald criteria (Polman et al., 2011). Disease severity was measured by the Expanded Disability Status Scale (EDSS). Two values of EDSS (t1 and t2) were available for the patients. The most recent (t2) was used to classify MS patients in two groups with different disease severity (mild: EDSS $\leq$ 3; severe: EDSS $>$ 3) according to (Puz et al., 2018). Disease progression was calculated as EDSS t2/time of disease (= progression index, PI). Patients were grouped according to PI in slow (PI $\leq$ 0.2) and rapid (PI $>$ 0.2) progressors according to Poser et al. (1982). Ninety-one MS patients receive IFN- β -based drugs. Treatment response was determined comparing EDSS between t2 and t1 within the time's interval (t2–t1). Treatment response was considered “good” when Δ EDSS/(t2–t1) $\leq$ 1, or “bad” for Δ EDSS/(t2–t1) $>$ 1. A summary of demographic and clinical characteristics of the cohort is reported in Tables 1 and 2. Ethnicity was defined according to the subjects' self-determination and participants, individually and as a group, have a mixed ethnic background (94% European Caucasian of several different countries of origin and 6% African), which reflects the South-eastern Brazilian population (Pena et al., 2011). 20 mL of peripheral blood were collected from 9 out of 209 MS patients for monocyte isolation and in vitro assays.

2.2. Controls

Genotyping data of two healthy donor groups (HD; n = 233) previously used in other studies were included in case/control analysis. Group 1 is formed by 137 healthy adults with more than 50 years old with no signs or symptoms of cancer or chronic diseases recruited at the “Hospital das Clinicas” of Faculty of Medicine of the University of Sao Paulo (FM-USP) (da Silva, 2016); group 2 is formed by 96 healthy adults with more than 56 years old and no sign or symptoms of

Table 1

Demographic and clinical data of case/control cohort.

A summary of main demographic and clinical characteristics of studied cohort was reported by the meaning of gender and age for healthy donors (HD) and patients; age at diagnosis, time of disease, age at first visit (t1), age at second visit (t2), disease severity at t1 and t2, disease progression, use of IFN- β based drugs and response to IFN- β based drugs for patients with multiple sclerosis (MS) or neuromyelitis Optica (NMO).

Disease severity was reported by the meaning of Expanded Disability Status Scale (EDSS) value. EDSS $\leq$ 3 indicated a mild disease; EDSS $>$ 3 indicated a severe disease.

Disease progression was reported as progression index (PI). PI $<$ 0.2 indicated a slow disease progression; IP $\geq$ 0.2 indicated a rapid disease progression.

Variables were compared among groups. * Fisher test p-value $<$ 0.05 (MS versus HD); § Mann–Whitney test p value $<$ 0.001 (MS versus HD).

Characteristics	HD (n = 233)	MS (n = 209)	NMO (n = 36)
Gender (M/F), n	83/150	49/161*	7/29
Age (years), median (min–max)	59 (25–92)	51 (20–77) §	49 (33–92)
Age at onset (years), median (min–max)	–	30 (10–67)	30 (16–58)
Time of disease (years), median (min–max)	–	12.0 (1–25)	12.6 (1.6–19.4)
Age at t1 , median (min–max)	–	39 (17–67)	37 (22–61)
Age at t2 , median (min–max)	–	47 (20–73)	44 (24–69)
Severity_t1 (EDSS), median (min–max)	–	3 (0–9.5)	4 (0–8.5)
Severity_t2 (EDSS), median (min–max)	–	5.5 (0–9.5)	4 (0–8.5)
Mild (EDSS $\leq$ 3) / Severe (EDSS $>$ 3), n	–	93/93	15/20
Progression (PI), median (min–max)	–	0.19 (0–0.56)	0.2 (0–0.8)
Slow (IP $<$ 0.2) / Rapid (IP $\geq$ 0.2)	–	94/92	17/18
Use of IFN-β-based drugs , n	–	89	2
Response to IFN-β-based drugs (yes/no), n	–	21/67	1/1

neurologic disorders proceeding from the “Hospital das Clinicas” of Federal University of Pernambuco (UFPE) (not yet published). Moreover, leucocytes’ concentrates obtained after plasmapheresis at the Blood Bank Service of the “Oswaldo Cruz” hospital in São Paulo (SP, Brazil) were used for peripheral blood monocytes isolation. All the volunteers signed an informed consent in compliance with the respective Institutional Ethics Committee.

2.3. SNPs selection and genotyping

Eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 5 inflammasome genes (*NLRP1*, *NLRP3*, *NLRP4*, *IL1B*, *IL18*) were selected based on previously published studies in neurologic and/or autoimmune diseases (Soares et al., 2018; Pontillo et al., 2015; Pontillo et al., 2012a; Pontillo et al., 2012b; Malhotra et al., 2015; Isik et al., 2013), functional effect (Levandowski, 2013; Hitomi et al., 2009; Verma et al., 2012; Zeller et al., 2015; Hall et al., 2004; He et al., 2010; Frayling et al., 2007; Matteini et al., 2014) and minor allele frequency (MAF $\geq$ 5% in the Caucasian population). Main information about the selected candidate SNPs are resumed in Table 3. SNPs genotyping was performed using

allele-specific TaqMan assays (Applied Biosystems, Thermofisher Scientific) and qPCR in a QuantStudio3 Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems).

2.4. Inflammasome profile in peripheral blood monocytes

0.2×10^6 /well peripheral blood monocytes were cultured in RPMI-1640 (Gibco/Thermofisher Scientific) with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and stimulated with 1 μ g/mL bacterial LPS (*Escherichia coli*, strain: O111:B4; Sigma–Aldrich) for 3 and 24 h. At the end of incubation, 1 mM adenosine-3-phosphate (ATP; Sigma–Aldrich) was added for more 15 min. IL-1 β and IL-18 concentrations were measured in culture supernatant before and after ATP addition by ELISA, according to fabricants (Biolegend). Cells were lysed for total RNA extraction (RNAqueous® Micro, Ambion, Thermofisher Scientific), and 300 ng of total RNA was retrotranscribed in cDNA (SuperScript® III RT-PCR kit, Invitrogen, Thermofisher Scientific). Inflammasome genes *NLRP1*, *NLRP3*, *NAIP*, *NLRP4*, *CASP1*, *IL1B*, *IL18* as well as the housekeeping gene *GAPDH* were amplified with gene-specific Taqman assays (Applied Biosystems) and qPCR on a QuantStudio3 Real-Time PCR equipment.

Table 2

Main characteristics of patients classified according to MS clinical form.

A summary of main demographic and clinical characteristics of MS patients classified according to their clinical form in relapsing-remitting (RR), secondary progressive (SP) and primary progressive (PP) form. Gender, age, age at diagnosis, time of disease, age at first visit (t1), age at second visit (t2), disease severity at t1 and t2, disease progression, were reported.

Disease severity was reported by the meaning of Expanded Disability Status Scale (EDSS) value. EDSS $\leq$ 3 indicated a mild disease; EDSS $>$ 3 indicated a severe disease.

Disease progression was reported as progression index (PI). PI $<$ 0.2 indicated a slow disease progression; IP $\geq$ 0.2 indicated a rapid disease progression.

Characteristics	RR (n = 118)	SP (n = 59)	PP (n = 32)
Gender (M/F), n	24/94	11/48	15/17
Age (years), median (min–max)	43 (30–77)	57 (27–75)	62 (45–74)
Age at onset (years), median (min–max)	27 (10–67)	31 (10–54)	41 (17–58)
Time of disease (years), median (min–max)	17.0 (1.6–53.1)	22.2 (8.5–45.1)	21.1 (12.4–55.1)
Age at t1 , median (min–max)	32 (19–67)	45 (17–64)	51 (33–63)
Age at t2 , median (min–max)	42 (22–72)	53 (28–73)	57 (41–71)
Severity_t1 (EDSS), median (min–max)	1 (0–6.5)	6 (0–8)	6 (1–9.5)
Severity_t2 (EDSS), median (min–max)	1 (0–7)	7 (1.5–9)	7 (6–9.5)
Mild (EDSS $\leq$ 3) / Severe (EDSS $>$ 3), n	82/15	9/50	4/27
Progression (PI), median (min–max)	0.08 (0–0.54)	0.29 (0.06–0.55)	0.35 (0.15–0.56)
Slow (IP $<$ 0.2) / Rapid (IP $\geq$ 0.2)	80/17	13/46	3/27

Table 3

Candidate SNPs selection.

The list of selected candidate SNPs in inflammasome genes is reported with basic information such as gene ID and locus, SNP ID and minor allele frequency (MAF) in Caucasian population (HapMap), polymorphic variation and consequent functional effect.

Gene ID (locus)	SNP ID	MAF	Variation	Functional effect	Ref
<i>NLRP1</i> (17p13.2)	rs12150220	T (0.46)	c.1019 A>T (L155H)	Haplotype increased IL-1 β processing	Levandowski (2013)
	rs11651270	G (0.47)	c.4015 A>G (M1154V)		
<i>NLRP3</i> (1q44)	rs10754558	G (0.36)	c.3745 C>G (3'UTR)	Increased the <i>NLRP3</i> mRNA stability	Hitomi et al. (2009)
	rs35829419	A (0.05)	c.2859 C>A (Q705K)	<i>NLRP3</i> inflammasome over activation (increased production of IL-1 β and IL-18)	Verma et al. (2012)
<i>NLR4</i> (2p22.3)	rs479333	G (0.31)	c. – 119 + 649 G>A (intron)	Decreased <i>NLR4</i> expression; Reduced serum concentration of IL-18	Zeller et al. (2015); Matteini (2014)
<i>IL1B</i> (2q14.1)	rs16944	T (0.36)	c. – 511 C>T (promoter)	Increased LPS-induced IL-1 β production	Hall et al. (2004)
<i>IL18</i> (11q23.1)	rs1834481	C (0.23)	c.79 + 1871 G>C (intron)	Reduced serum concentration of IL-18	He et al. (2010)
	rs5744256	C (0.22)	c.80–1919 T>C (intron)	Reduced serum concentration of IL-18	Frayling et al. (2007)

Table 4

Variants associated with low level of serum IL-18 protect against MS development.

Association results are reported for *IL18* SNPs in case/control cohort. SNP ID, genotypes and their distribution within multiple sclerosis patients (MS) and control group (healthy donors, HD) are reported as well as multivariate analysis p value, Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) adjusted for gender and age according to a recessive model of inheritance for the minor allele.

SNP ID	Genotypes	MS (n = 209)	HD (n = 233)	P _{adj}	OR _{adj}	95% CI
rs5744256	A/A + A/G	137 + 66 (0.98)	163 + 56 (0.94)	0.027	Ref	
	G/G	6 (0.02)	14 (0.06)		0.29	0.09–0.93
rs1834481	C/C + C/G	140 + 63 (0.97)	163 + 49 (0.91)	0.010	Ref	
	G/G	6 (0.03)	21 (0.09)		0.26	0.09–0.77

The QuantStudio™ Design Analysis software was used to obtain cycle threshold (Ct) data. Ct ≥ 35 were excluded from the analysis. Relative gene expression was calculated according to (Schmittgen, 2008). Briefly, normalized data ($\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{target}} - \Delta Ct_{\text{GAPDH}}$) were used both to calculate basal gene expression ($2^{-\Delta Ct}$) or gene expression modulation after LPS stimulation (Fold Change/FC = $2^{-\Delta \Delta Ct}$, where $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{LPS}} - \Delta Ct_{\text{un}}$).

2.5. Data analyses

Fisher test and Mann Whitney test were used to compare demographic and clinical variables (binomial and continuous non-parametric, respectively) within the cohort.

Multivariate analysis based on general linear model (GLM) was performed to evaluate SNPs distribution using R-project package “SNP-assoc” version 1.5-2. Confounders variables (gender, age, age of onset, time of disease) were included in the model as specified during results presentation. Analyses were performed in the “codominant”, “dominant”, “recessive”, “overdominant” and “log-additive” models of inheritance for all SNPs, according to Akaike Information Criterion (AIC). The R-project package “proxysnps” was used to investigate the linkage disequilibrium (LD) of SNPs in the same gene (*NLRP1*, *NLRP3*, *IL18*) or locus (chromosome 2: *NLR4* and *IL1B*) and to derive the haplotypes. We applied a correction for multiple comparisons considering the number of independent SNPs and fixed the significant threshold at $p = 0.013$ (0.05/4).

Non-parametric 1-Way ANOVA was performed to compare cytokines production in patients and healthy donors (differences with $p < 0.05$ was considered significant).

Non-parametric paired t test was used to compare gene expression between LPS-stimulated and unstimulated cells (differences with $p < 0.05$ was considered significant). Non-parametric unpaired 1-way ANOVA was performed to compare gene expression between groups (patients versus healthy donors).

3. Results

3.1. Association study

Eight selected SNPs in 5 inflammasome genes were genotyped in 264 unrelated individuals with MS and other demyelinating diseases (Supplementary file 1). SNPs frequencies' distribution resulted in Hardy-Weinberg equilibrium ($p < 0.05$). *NLRP1*, *NLRP3* and *IL18* SNPs resulted in moderate LD (D' : 0.43, 0.63 and 0.71, respectively) (Supplementary File 2).

First, we assessed the comparison between MS patients and control group. Gender and age were included as confounder variables in multivariate analysis. While the distribution of SNPs in *NLRP1*, *NLRP3*, *NLR4* and *IL1B* did not result significantly different between MS and HD (Supplementary File 1), we observed a higher frequency of minor genotype of *IL18* rs1834481 C > G (G/G: 0.09) and rs5744256 A > G (G/G: 0.06) in HD compared to MS group (0.03 and 0.03, respectively) (Table 4). While adjusted p value for rs5744256 was < 0.05 but > 0.013 , rs1834481 polymorphism resulted significantly associated to MS also according to Bonferroni correction ($p_{\text{adj}} = 0.010$; $OR_{\text{adj}} = 0.26$, according to a recessive model of inheritance). Haplotype analysis did not report any significant result, and particularly, the distribution of the haplotype containing the minor allele of both *IL18* SNPs (namely, rs1834481/G and rs5744256/G) did not result significantly different between case and control groups ($p_{\text{adj}} = 0.019$) (Supplementary File 3). Even if not specific for PBMC or brain, eQTL data (gtexportal.org) for these variants show that they lead to diminish expression of *IL18* gene (Supplementary File 4). Moreover, taking in account previous works showing that both *IL18* variants correlate with lower serum level of IL-18 (He et al., 2010; Frayling et al., 2007; Matteini et al., 2014), these findings suggest that lower plasma level of IL-18 could be beneficial against the development of MS.

The comparison of SNPs distribution between MS and other not-MS diseases in our cohort (mainly NMO, see Table 1) did not return any significant results (Supplementary File 1).

When the severity of MS was taking in account (in term of EDSS categories or EDSS values), the analysis was performed including gender, age-at-onset, age at t2 and time of disease (complete results are

Table 5

Variants associated with constitutive activation of inflammasome contribute to MS severity and progression.

Multivariate analysis was performed in MS patients according to disease severity (by the meaning of EDSS) and progression (by the meaning of PI). Only statistically significant results are reported. SNP ID, genotypes and their distribution within multiple sclerosis patients (MS) are reported as well as p value, Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) for binary comparisons; or as mean and standard error, difference from reference (Dif) and 95% CI for continuous variables. Only p values adjusted for gender, age-at-onset, age at t2 and time of disease are reported. Data for rs16944 and rs479333 are presented according to a dominant or recessive model of inheritance. Ref: reference genotype; NC: not calculated.

Severity (EDSS)		Mild MS (n = 93)	Severe MS (n = 93)	P _{adj}	OR	95% CI
SNP ID	Genotypes					
rs35829419	C/C	92 (0.99)	87 (0.93)	0.011	Ref	1.23–106.9
	C/A	1 (0.01)	6 (0.07)		11.47	
rs16944	C/C	39 (0.42)	24 (0.26)	0.015	Ref	1.17–4.94
	C/T + T/T	44 + 10 (0.58)	53 + 16 (0.74)		2.40	
SNP ID	Genotypes	Individuals (n, frequency)	EDSS (mean ± SE)	P_{adj}	Dif	95% CI
rs16944	C/C	63 (0.34)	3.38 ± 0.38	0.009	Ref	0.29–1.92
	C/T + T/T	97 + 26 (0.66)	4.58 ± 0.27		1.10	
Progression (PI)						
SNP ID	Genotypes	Slow MS (n = 94)	Rapid MS (n = 92)	P_{adj}	OR	95% CI
rs35829419	C/C	94 (100)	85 (0.92)	6.6 exp-4	Ref	NC
	C/A	0	7 (0.08)		NC	
rs479333	G/G	23 (0.24)	39 (0.42)	0.002	Ref	0.17–0.69
	G/C + C/C	53 + 18 (0.76)	40 + 13 (0.58)		0.35	
rs16944	C/C	42 (0.45)	21 (0.23)	0.004	Ref	1.33–4.92
	C/T + T/T	44 + 8 (0.55)	53 + 18 (0.77)		2.56	
SNP ID	Genotypes	Individuals (n, frequency)	PI (mean ± SE)	P_{adj}	Dif	95% CI
rs35829419	C/C	169 (0.91)	0.20 ± 0.01	0.015	Ref	0.03–0.25
	C/A	17 (0.09)	0.33 ± 0.05		0.15	
rs479333	G/G	61 (0.33)	0.23 ± 0.02	0.024	Ref	–0.10–0.01
	G/C + C/C	97 + 28 (0.67)	0.19 ± 0.01		–0.05	
rs16944	C/C	61 (0.33)	0.15 ± 0.02	0.002	Ref	0.03–0.12
	C/T + T/T	93 + 32 (0.67)	0.23 ± 0.01		0.075	

found in Supplementary File 5). *NLRP3* rs35829419 C > A and *IL1B* rs16944 C > T polymorphisms resulted more frequent in patients with severe MS (0.07 and 0.74, respectively) than in patients with a mild presentation of the disease (0.01 and 0.58, respectively), however only *NLRP3*rs35829419 continued significantly associated to MS severity ($p_{adj} = 0.011$; $OR_{adj} = 11.47$) after Bonferroni correction (Table 5). On the other hands, when EDSS value was analyzed as continuous variable, *IL1B* rs16944 polymorphism, and not *NLRP3* rs35829419 ($p_{adj} = 0.148$), was significantly associated to higher EDSS average value ($p_{adj} = 0.009$, according to a dominant model of inheritance) (Table 5).

As expected, both variants were also more frequent in rapid progressors (0.08 and 0.77, respectively) than in slow ones (0.0 and 0.55, respectively), and both in a statistically significant way ($p_{adj} = 6.6 \exp-4$ and 0.004, respectively). When PI values were taking in account, *IL1B* rs16944 resulted significantly associated to higher IP average value ($p_{adj} = 0.004$, according to a dominant model of inheritance) (Table 5).

Taking together, these findings support a risk role for *NLRP3*rs35829419 and *IL1B* rs16944 toward MS severity and prognosis.

Intriguingly the *NLR4*rs479333 G > C SNP resulted less frequent in rapid progressors (0.58) than in slow ones (0.76; $p_{adj} = 0.002$), suggesting a protection effect of this variant against a bad prognosis ($OR_{adj} = 0.35$ in a dominant model of inheritance). Accordingly, the minor allele containing genotypes associated to a lower IP value compared to the homozygote G/G (0.19 versus 0.23), even if this difference did not reach statistical significance after Bonferroni correction ($p_{adj} = 0.024$). (Table 5)

Analysis was then performed comparing SNPs distribution in different clinical forms of MS (RR, SP and PP). Due to the limited size of SP and PP groups, we analysed progressive forms as a unique group (P), trying to increase statistical power (Complete results in Supplementary file 6). The gain-of-function variant *IL1B* –511 C > T resulted significantly more frequent in the RR form of MS (0.54) than in the progressive one (0.46) ($p_{adj} = 0.004$, according to a “log-additive” model of inheritance) (Table 6). Once more this data emphasizes the

Table 6

Gain-of-function promoter variation in *IL1B* (rs16944) confers risk to the development of progressive form of MS.

Multivariate analysis was performed in MS patients classified according to clinical form in Relapsing Remitting (RR) MS and Progressive MS. Only statistically significant results are reported. rs16944 genotypes and their distribution, p value, Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) adjusted by gender, age at onset and age at t2 are indicated according a “log-additive” model of inheritance.

rs16944 genotypes	RR (n = 118)	P (n = 91)	P _{adj}	OR _{adj}
C/C	48 (0.41)	25 (0.27)	0.004	2.11 (1.25–3.56)
C/T	56 (0.47)	48 (0.53)		
T/T	14 (0.12)	18 (0.20)		

prejudicial role of increased IL-1 β in MS phenotype.

With the aim to replicate previous findings about the association between *NLRP3* Q705K and response to IFN- β treatment in MS patients (Malhotra et al., 2015), we executed multivariate analysis comparing SNPs distribution between responders and non-responders to IFN- β treatment. Complete results are available in Supplementary file 7. Intriguingly *NLRP3*SNPs did not associate to treatment response, however *NLR4* rs479333 variant resulted significantly more frequent in good responders (0.90) than in bad ones (0.62) ($p_{adj} = 0.006$; $OR_{adj} = 6.4$, according a dominant model of inheritance) (Table 7), suggesting that the variant rs47933 contributes to a more effective response to treatment.

Altogether data from association analysis support the idea that an increased activation of inflammasome, in term of IL-1 β or IL-18 production, could represent a risk for MS development.

3.2. Inflammasome profile in MS peripheral blood monocytes

Taking in account above mentioned results, and the hypothesis that an increased *NLRP3* inflammasome activation contributes to a worsen prognosis of MS, we measured the responsiveness of peripheral blood monocytes of MS patients (n = 9) against *NLRP3* activators

Table 7

Intronic SNP in *NLRP3*, but not *NLRP3* Q705K variant, significantly associated to IFN- β response in MS patients.

Multivariate analysis was performed in MS patients according to response to IFN- β treatment. Only results for *NLRP3* rs35829419 and *NLRP3* rs479333 are reported. SNP ID, genotypes and their distribution within the group of multiple sclerosis patients with a good or bad response to IFN- β treatment. Multivariate analysis p value, Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Interval (CI) are reported. Gender and age are included in the analysis as confounder variables (adjusted analysis).

SNP ID	Genotypes	Good responders (n = 24)	Bad responders (n = 67)	P _{adj}	OR _{adj} (95% CI)
rs35829419	C/C	24 (1.0)	63 (0.94)	0.166	Ref
	C/A	0	4 (0.06)		
rs479333	G/G	2 (0.10)	25 (0.38)	0.006	Ref
	C/G + C/C	17 + 5 (90)	28 + 14 (62)		

(LPS $\pm$ ATP), and compared to HD ones (n = 10). As reported in Fig. 1, LPS induced a significant increasing of IL-1 β , IL-18 and TNF at 3 and 24 h (LPS versus untreated cells; p < 0.05), both in MS and HD monocytes. Of note we observed a significant higher production of IL-1 β in MS monocytes stimulated with LPS for 3 h (but not 24 h) compared to HD ones (p = 0.002; Fig. 1A). When ATP was added to the cultures, IL-1 β production increased in LPS-treated monocytes (ATP + LPS versus LPS; p < 0.05), however the cytokine production did not significantly differ between MS and HD cells (p > 0.05; Fig. 1A). After 24 h of LPS stimulation, monocytes produced high level of IL-1 β , which could not be increased by ATP (Fig. 1A). ATP did not significantly affect IL-18 (Fig. 1B) or TNF (Fig. 1C) production.

We would like to emphasize that cytokines' production did not differ between treated (n = 4) and not treated (n = 5) MS patients (p > 0.05; data not shown).

These data suggest that *NLRP3* inflammasome correctly work in patients, even if MS monocytes appeared to be “primed”, at least for IL-1 β , and for this reason they are able to process a higher quantity of the cytokine when stimulated with LPS.

LPS-treated MS monocytes up-regulated several inflammasome genes (Fig. 2A), and specifically *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* as highlighted in Fig. 2B. The expression of *NLRP3* and *CASP1* in LPS-treated cells compared to untreated ones resulted significantly higher in MS than in HD monocytes (p < 0.05).

Altogether, data from in vitro assays suggested that peripheral blood monocytes from MS patients are able to correctly activate *NLRP3* inflammasome in response to classical triggers (LPS, ATP), but they present a constitutive activate complex (also supported by expression profile) and consequently produced higher level of IL-1 β . For what concern IL-18, we observed a lower level of cytokine production from monocytes compared to IL-1 β both in MS and HD cells, and only a not significant tendency of augment in MS cells after 24 h of LPS stimulation.

4. Discussion

Etiology of multiple sclerosis is still unknown, however experimental and epidemiologic evidences supported a pathogenetic model in which genetic, infectious and environmental factors lead to the loss of self-tolerance and the inflammatory process against myelin and SNC components.

The activation of *NLRP3* inflammasome was recognized as an important mechanism for the development and severity of EAE (Shaw et al., 2010). In this model, the encephalomyelitis is sustained by Th1 and Th17 lymphocytes (Constantinescu et al., 2011), and inflammasome-dependent cytokines IL-18 and IL-1 β contribute to the polarization of T CD4+ naïve cells toward those subsets (Shaw et al.,

Fig. 1. Cytokines production in monocytes from MS patients and healthy donors

Peripheral monocytes from multiple sclerosis patients (MS; n = 9) and healthy donors (HD; n = 10) were stimulated with 1 μ g/mL LPS for 3 and 24 h. At the end of incubation 1 mM ATP was added for 15 minutes more. IL-1 β (A), IL-18 (B) and TNF (C) were measured in culture supernatants by ELISA. Cytokines production was compared in untreated and treated cells, and between HD and MS cells using Kruskal–Wallis paired test. *: treated versus untreated (UN); p < 0.05; §: MS versus HD; p < 0.05. LPS, lipopolysaccharide; ATP, adenosine triphosphate.

2010).

Our findings support both experimental results as well as previously reported data in MS patients: a constitutive inflammasome activation, possibly of *NLRP3*-inflammasome, and the consequent increased IL-1 β and IL-18 production, represents a risk factor for the development of MS and for progression to severe forms of the disease (higher EDSS and IP, progressive forms).

High IL-18 levels have been reported in patients with chronic progression and relapsing patients in remission (Huang et al., 2013; Karni et al., 2002; Losy, 2001; Nicoletti et al., 2001), suggesting that genetic variants affecting cytokine expression could represent a risk factor for MS. We analyzed two SNPs in *IL18* known to reduce its plasma level

LPS compared to untreated cells.

(B) Fold-change modulation of *NLRP3*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes in monocytes from MS patients with multiple sclerosis and from healthy donors (HD) challenged for 3 h with LPS compared to untreated cells. *: multiple t test p-value < 0.05.

(Frayling et al., 2007; Matteini, 2014; He et al., 2010) and, as expected, they resulted associated to protection against the development of MS, emphasizing a pathogenic role of IL-18 in the disease.

Furthermore, Willing and collaborators elegantly demonstrated that plasma IL-18 is responsible for activating a subset of mucosal associated CD8+ T cells, which infiltrate CNS and contribute to the pathogenesis of MS (Willing et al., 2014).

Accordingly, the -511 C > T promoter variant (rs16944) and the related constitutive increased level of pro-IL-1 β (Hall et al., 2004) associated to a more severe MS presentation, both considering severity indexes (EDSS, IP) or clinical forms (P > RR), once more emphasizing that inflammasome activation represents a detrimental mechanism in MS. It is interesting to stress that, maybe due to the limited size of our cohort, and despite suggesting a same general concept about inflammasome contribution in MS, the selected variants in *IL1B* or *IL18* were not associated together with susceptibility or with progression and severity, letting us hypothesizing that each cytokine could uniquely contribute, or plays a major role, in MS triggering (IL-18/Th1 pathway?) or in CNS chronic inflammation amplifying the immune response and immuno-mediated neurological damage (IL-1 β /Th17 and macrophages?) (Gadani, 2015).

Also considering that our candidate SNPs-based approach did not entirely cover selected inflammasome genes, our results suggest that a constitutive activation of *NLRP3* (related to the missense variation Q705K, rs35829419, as demonstrated by Verma et al. (2012), rather than of other receptors such as *NLRP1* or *NLRC4*, represents a risk factor for severe MS. Of note, gain-of-function mutations of *NLRP3* in patients with *NLRP3*/cryopyrin associated periodic syndrome (CAPS; OMIM: 606416) have been reported in early-onset MS (Schuh et al., 2015), supporting our findings.

The activation profile of *NLRP3* inflammasome in monocytes of MS patients corroborates the genetic data and our hypothesis of a constitutive activation of the complex in MS patients. These data are also in line with what has previously been reported in the literature. MS patients present higher levels of ASC, caspase-1 and IL-18 in serum (Keane et al., 2018).

Once perceived that *NLRP3* inflammasome is activated in MS, several points remain obscure: what is recognized by *NLRP3* and finally activated the inflammasome? This activation occurs in the periphery and in the CNS, as reported by autaptic brain histology (Burm et al., 2016), in infiltrating leukocytes as well as in resident cells (microglia, astrocytes, oligodendrocytes, neurons). While the initial trigger is unknown, thereafter the immune attack against axonal myelin and the

Fig. 2. LPS differently modulates the expression of inflammasome genes in MS and HD monocytes.

Peripheral monocytes from multiple sclerosis patients (MS; n = 9) and healthy donors (HD; n = 10) were stimulated with 1 μ g/mL LPS for 3 and 24 h. At the end of incubation 1 mM ATP was added for 15 min more. Cells were lysed for RNA extraction and gene expression analysis. The expression of *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes was evaluated in monocytes stimulated with LPS compared to untreated cells. The modulation of gene expression was calculated as Fold-Change (FC) according to Schmitten (2008). (A) Heatmap presented the logFC values for expression of the *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *NAIP*, *CASP1*, *IL1B* and *IL18* genes in monocytes from MS patients with multiple sclerosis and from healthy donors (HD) challenged for 3 h with

consequent cortical lesion originated DAMPs that could activate *NLRP3* in situ, causing a cycle of lesions and worsening of the clinical picture, as previously described as cause of neurodegeneration (Rubartelli, 2014).

We then tried to replicate the association between *NLRP3* SNPs and response to IFNA treatment observed by Malhotra et al. (2015), however, maybe due to the limited size of IFNA-treated patients in our cohort (89 out of 210 patients), we cannot observe any significant results. On the other hands, for the first time, we reported the significant association of a loss-of-function *NLRC4* variant (rs479333) with treatment response. This data together with the association with better progression, suggested that rs479333 polymorphism, through a lower availability of *NLRC4* (Zeller et al., 2015) and/or a lower IL-18 production (Matteini, 2014), represent a beneficial factor for MS patients, reinforcing the idea that lower level of IL-18 representing a protection factor against neurologic dysfunction in MS.

Altogether data from association analysis support the idea that an increased activation of inflammasome, in term of IL-1 β or IL-18 production, could represent a risk for MS development. Moreover, these results suggest that a constitutive activation of *NLRP3* plays a major role in inflammasome activation in MS patients. As original findings, *NLRC4*, possibly through the modulation of IL-18 level (Matteini et al., 2014), also appears to play a role in MS pathogenesis. Previous studies have been pointed out the role of both *NLRP3* and *NLRC4* in sterile neuroinflammation and demyelination (Freeman et al., 2017).

5. Conclusions

In conclusion, this study emphasizes that a constitutive activation of *NLRP3* inflammasome, principally through IL-1 β production, represents a risk factor for both the development of MS and the progression to severe forms of the disease. On the other hands, low IL-18 production and/or *NLRC4* activation resulted beneficial for MS patients.

Acknowledgments

We acknowledged all the staff of “Ambulatório de Doenças Desmielinizantes” of Federal University of Sao Paulo State (UNIFESP) (Sao Paulo, SP, Brazil) for patients’ recruitment and blood collection; Dr. Wanessa da Silva and Dr. Telma M. Oshiro (FMUSP) for HD group 1 genotyping data sharing; Mr. Tiago Sampaio and Prof. Paulo R. de Souza (UFRPE) for HD group 2 genotyping data sharing.

Funding sources

This work was supported by the “Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo” [FAPESP; grant numbers: 2015/23395-6, and 2015/50650-7]; the National Council for Research [CNPq]. AP and EO received a Research Fellowship from CNPq. JS received a Master's degree Fellowship from CAPES.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.msard.2019.01.023.

References

- Alpayci, M., Bozan, N., Erdem, S., Gunes, M., Erden, M., 2012. The possible underlying pathophysiological mechanisms for development of multiple sclerosis in familial Mediterranean fever. *Med. Hypotheses* 78 (6), 717–720.
- Annapurna, A., Krlshna, KV, Murali Mohan Rao, P., Someswara Rao, K., Rajasekhar, J., 2002. Multiple sclerosis: the disease and its treatment. *Ind. J. Pharmacol.* 34, 3–15.
- Balashov, KE, Rottman, JB, Weiner, HL, Hancock, WW, 1999. CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 α and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 6873–7688.
- Baranzini S E and Oksenberg J R. The genetics of multiple sclerosis: from 0 to 200 in 50 years, *Trends Genet.*, 2017, 33, 960970.
- Burm, SM, Peferoen, LA, Zuiderwijk-Sick, EA, Haanstra, KG, 't Hart, BA, van der Valk, P, Amor, S, Bauer, J, Bajramovic, JJ, 2016 Jun 6. Expression of IL-1 β in rhesus EAE and MS lesions is mainly induced in the CNS itself. *J. Neuroinflammation* 13 (1), 138.
- Compston, A, Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372 (9648), 1502–1517 Oct 25.
- Constantinescu, CS, Farooqi, N, O'Brien, K, Gran, B, 2011. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br. J. Pharmacol* 164 (4), 1079–1106.
- da Silva, WC, Oshiro, TM, de Sá, DC, Franco, DD, Festa Neto, C, Pontillo, A., 2016 Oct. Genotyping and differential expression analysis of inflammasome genes in sporadic malignant melanoma reveal novel contribution of *CARD8*, *IL1B* and *IL18* in melanoma susceptibility and progression. *Cancer Genet* 209 (10), 474–480 Oct.
- Frayling, TM, Rafiq, S, Murray, A, Hurst, AJ, Weedon, MN, Henley, W, Bandinelli, S, Corsi, AM, Ferrucci, L, Guralnik, JM, Wallace, RB, Melzer, D, 2007 Jan Jan. An interleukin-18 polymorphism is associated with reduced serum concentrations and better physical functioning in older people. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci* 62 (1), 73–78.
- Freeman, L, Guo, H, David, CN, Brickey, WJ, Jha, S, Ting, JP-Y, 2017. NLR members NLRC4 and *NLRP3* mediate sterile inflammasome activation in microglia and astrocytes. *J. Exp. Med.* 214 (5), 1351–1370.
- Furlan, R, Martino, G, Galbiati, F, Poliani, PL, Smiroldo, S, Bergami, A, Desina, G, Comi, G, Flavell, R, Su, MS, Adorini, L, 1999. Caspase-1 regulates the inflammatory process leading to autoimmune demyelination. *J. Immunol.* 163, 2403–2409.
- Gadani, SP, Kipnis, J., 2015. Brainless immunity no more. *Nat. Immunol* 16 (5), 440–441 May.
- Hall, SK, Perregraux, DG, Gabel, CA, Woodworth, T, Durham, LK, Huizinga, TW, Breedveld, FC, Seymour, AB, 2004 Jun Jun. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. *Arthritis Rheum* 50 (6), 1976–1983.
- Harbo, HF, Gold, R, Tintore, M, 2013. Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Ther. Adv. Neurol. Disord* 6, 237–248.
- Hausner, SL, Oksenberg, JR, 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 52, 61–76.
- He, M, Cornelis, MC, Kraft, P, van Dam, RM, Sun, Q, Laurie, CC, Mirel, DB, Chasman, DI, Ridker, PM, Hunter, DJ, Hu, FB, Qi, L, 2010 Apr Apr. Genome-wide association study identifies variants at the IL18-BCO2 locus associated with interleukin-18 levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30 (4), 885–890.
- Hitomi, Y, Ebisawa, M, Tomikawa, M, Imai, T, Komata, T, Hirota, T, Harada, M, Sakashita, M, Suzuki, Y, Shimojo, N, Kohno, Y, Fujita, K, Miyatake, A, Doi, S, Enomoto, T, Taniguchi, M, Higashi, N, Nakamura, Y, Tamari, M, 2009. Associations of functional *NLRP3* polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol* 124, 779–885.
- Huang, J, Xie, ZK, Lu, RB, Xie, ZF, 2013. Association of interleukin 1 gene polymorphisms with multiple sclerosis: a meta-analysis. *Inflamm. Res.* 62, 97–106.
- Isik, N, Arman, A, Canturk, IA, Gurkan, AC, Candan, F, 2013. Multiple sclerosis: association with the interleukin-1 gene family polymorphisms in the Turkish population. *Int. J. Neurosci.* 123, 711–718.
- Karni, A, Koldzic, DN, Bharanidharan, P, Khoury, SJ, Weiner, HL, 2002. IL-18 is linked to raised IFN- γ in multiple sclerosis and is induced by activated CD4(+) T cells via CD40-CD40 ligand interactions. *J. Neuroimmunol.* 125, 134.
- Keane, RW, Dietrich, WD, de Rivero Vaccari, JP, 2018. Inflammasome proteins as biomarkers of multiple sclerosis. *Front. Neurol* 9, 135. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00135>.
- Lalor, SJ, Dungan, LS, Sutton, CE, Basdeo, SA, Fletcher, JM, Mills, KH, 2011. Caspase-1 processed cytokines IL-1 β and IL-18 promote IL-17 production by gammadelta and CD4 T cells that mediate autoimmunity. *J. Immunol* 186, 5738–5748.
- Lamkanfi, M, Dixit, VM, 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022.
- Levandowski, CB, et al., 2013. *NLRP1* haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 β processing via the *NLRP1* inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 2952–2956.
- Losy, J, Niezgoda, A, 2001. IL-18 in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 104, 171.
- Malhotra, S, Rio, J, Urcelay, E, Nurdinov, R, Bustamante, MF, Fernandez, O, Oliver, B, Zettl, U, Brassat, D, Killestein, J, Lechner-Scott, J, Drulovic, J, Chan, A, Martinelli-Boneschi, F, Garcia-Merino, A, Montalban, X, et al., 2015. *NLRP3* inflammasome is associated with the response to IFN- β in patients with multiple sclerosis. *Brain* 138 (Pt 3), 644–652.
- Mann, CL, Davies, MB, Stevenson, VL, et al., 2002. Interleukin 1 genotypes in multiple sclerosis and relationship to disease severity. *J. Neuroimmunol.* 129, 197–204.
- Martinon, F, Burns, K, Tschopp, J, 2002. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-1 β . *Mol. Cell.* 10, 417.
- Matteini, AM, Li, J, Lange, EM, Tanaka, T, Lange, LA, Tracy, RP, Wang, Y, Biggs, ML, Arking, DE, Fallin, MD, Chakravarti, A, Psaty, BM, Bandinelli, S, Ferrucci, L, Reiner, AP, Walston, JD, 2014. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1 α in older adults. *Cytokine* 65, 10–16.
- Nicoletti, F, Di Marco, R, Mangano, K, Patti, F, Reggio, E, Nicoletti, A, Bendtzen, K, Reggio, A, 2001. Increased serum levels of interleukin-18 in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 57, 342.
- Noseworthy, JH, Lucchinetti, C, Rodriguez, M, Weinshenker, BG, 2000. Multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med* 343, 938–952.
- Noseworthy, JH, 1999. Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40–A47.
- Orhan, G, Eruray, E, Mungan, SO, Ak, F, Karahalil, B, 2016. The association of IL-18 gene promoter polymorphisms and the levels of serum IL-18 on the risk of multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg* 146, 96–101.
- Pena, SD, Di Pietro, G, Fuchshuber-Moraes, M, Genro, JP, Hutz, MH, Kehdy Fde, S, et al., 2011. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 6 (2), e17063.
- Perry, VH, Teeling, J, 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Semin. Immunopathol.* 35, 601–612.
- Polman, CH, Reingold, SC, Banwell, B, Clanet, M, Cohen, JA, Filippi, M, Fujihara, K, Havrdova, E, Hutchinson, M, Kappos, L, Lublin, FD, Montalban, X, O'Connor, P, Sandberg-Wollheim, M, Thompson, AJ, Waubant, E, Weinshenker, B, Wolinsky, JS, 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol* 69 (2), 292–302.
- Pontillo, A, Catamo, E, Arosio, B, Mari, D, Crovella, S, 2012a. *NALP1/NLRP1* genetic variants are associated with Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 26, 277–281 (a).
- Pontillo, A, Girardelli, M, Kamada, AJ, Pancotto, JA, Donadi, EA, Crovella, S, Sandrin-Garcia, P, 2012b. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 45 (4), 271–278 Jun(b).
- Pontillo, A, Reis EC, Liphauas BL, Silva CA, Carneiro-Sampaio M. Inflammasome polymorphisms in juvenile systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*. 2015;48(7):434–437.
- Poser, S, Raun, NE, Poser, W, 1982. Age at onset, initial symptomatology and the course of multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 66, 355–362.
- Puz, P, Lasek-Bal, A, Steposz, A, Bartoszek, K, Radecka, P, 2018. Effect of comorbidities on the course of multiple sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 167, 76–81.
- Rubartelli, A, 2014. DAMP-mediated activation of *NLRP3*-inflammasome in brain sterile inflammation: the fine line between healing and neurodegeneration. *Front. Immunol* 5, 99 Mar 17.
- Sato, K, Miyoshi, F, Yokota, K, Araki, Y, Asanuma, Y, Akiyama, Y, Yoh, K, Takahashi, S, Aburatani, H, Mimura, T, 2011. Marked induction of c-Maf protein during Th17 cell differentiation and its implication in memory Th cell development. *J. Biol. Chem* 286, 14963–14971.
- Schmittgen, TD, Livak, KJ, 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc* 3 (6), 1101–1108.
- Schuh, E, Lohse, P, Ertl-Wagner, B, Witt, M, Krumbholz, M, Frankenberger, M, Gerdes, LA, Hohlfeld, R, Kumpfel, T, 2015. Expanding spectrum of neurologic manifestations in patients with *NLRP3* low-penetrance mutations. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* 2, e109.
- Scolding, N, 2001. The differential diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 71, ii9–i15.
- Shaw, PJ, Lukens, JR, Burns, S, Chi, H, McGargill, MA, Kanneganti, TD, 2010. Cutting edge: critical role for PYCARD/ASC in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 184 (9), 4610–4614 May 1.
- Shibatani, K, Ida, H, Yamasaki, S, Nakashima, T, Origuchi, T, Kawakami, A, Migita, K, Kawabe, Y, Tsujihata, M, Anderson, P, Eguchi, K, 2001. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death: high serum levels and low natural killer cell numbers in patients with systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* 44, 884–892.
- Soares, JLS, Fernandes, FP, Patente, TA, Monteiro, MB, Parisi, MC, Giannella-Neto, D, Corrêa-Giannella, ML, Pontillo, A, 2018 Feb Feb. Gain-of-function variants in *NLRP1* protect against the development of diabetic kidney disease: *NLRP1* inflammasome role in metabolic stress sensing. *Clin. Immunol.* 187, 46–49.
- Trapp, BD, Nave, KA., 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 247–269.
- Verma, D, Särndahl, E, Andersson, H, Eriksson, P, Fredrikson, M, Jönsson, JI, Lerm, M, Söderkvist, P, 2012. The Q705K polymorphism in *NLRP3* is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin-1 β and IL-18 production. *PLoS One* 7,

- e34977.
- Willing, A, Leach, OA, Ufer, F, Attfield, KE, Steinbach, K, Kursawe, N, Piedavent, M, Friese, MA, 2014. CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol* 44, 3119–3128.
- Zeller, T, Haase, T, Müller, C, Riess, H, Lau, D, Zeller, S, Krause, J, Baumert, J, Pless, O, Dupuis, J, Wild, PS, Eleftheriadis, M, Waldenberger, M, Zeilinger, S, Ziegler, A, Peters, A, Tiret, L, Proust, C, Marzi, C, Munzel, T, Strauch, K, Prokisch, H, Lackner, KJ, Herder, C, Thorand, B, Benjamin, EJ, Blankenberg, S, Koenig, W, Schnabel, RB, 2015. Molecular characterization of the NLRC4 expression in relation to Interleukin-18 levels. *Circ. Cardiovasc. Genet* 8, 717–726.