GUILHERME SCIASCIA DO OLIVAL

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E IMAGIOLOGICA DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA E ASSOCIAÇÃO
COM RETROVÍRUS ENDOGENO DA FAMÍLIA W**

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade
de São Paulo para obtenção de título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças
Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Camila
Malta Romano.

Co-orientador: Prof. Dr. Charles Peter
Tilbery

**São Paulo
2018**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Olival, Guilherme Sciascia do

Caracterização clínica e imagiológica de pacientes com esclerose múltipla e associação
com retrovírus endógeno da família W / Guilherme Sciascia do Olival. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Camila Malta Romano

Descritores: 1. ESCLEROSE MÚLTIPLA. 2. RETROVIRIDAE. 3. HERPESVIRIDAE.

USP/IMTSP/BIB-12/2018.

Dedico essa tese primeiramente a você, querido leitor.

Não creio que nada dessa vida tenha significado, a não ser aquele você mesmo atribui ao que faz. Nessa vida, até o momento, não pude encontrar significado maior do que a manifestação da dedicação em forma de serviço. Meu serviço na forma de médico atendendo pacientes, na forma de professor ensinando a arte que aprendi ou na forma de cientista buscando aumentar as fronteiras do conhecimento é meu propósito no mundo. Nada me alegra mais do que expressar a minha alma, e essa expressão, hoje, na forma de tese, tento apresentar livre de vaidades, entregando o resultado desse esforço para o Universo. Desejo que você leitor possa aprender algo, refletir sobre algo, pois tudo que fiz foi para que o Universo se manifeste através de você.

Dedico essa tese também a meus queridos pacientes.

Fui agraciado desde muito cedo com o dom da empatia e assim posso sentir profundamente o sofrimento de meus pacientes. Desde então tenho buscado o propósito de aliviar o sofrimento. A grande motivação que surge de realizar pesquisa, encontrar respostas é encontrar a cura, quando possível, e o alívio do sofrimento, sempre. Portanto, não posso deixar de dedicar a meus pacientes essa tese, pois são a força motriz que me empurra a constante insatisfação do conhecimento que temos hoje, e para quem me dedico, por vezes, integralmente.

Olival GS. Caracterização clínica e imagiológica de pacientes com esclerose múltipla e a associação com retrovírus endógeno da família W [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

RESUMO

Introdução: A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória autoimune desmielinizante. Diversos estudos evidenciaram a forte associação entre a EM e a expressão do retrovírus endógeno da família W (HERV-W) e do Epstein Barr Vírus (EBV), sem definir seu real papel no desenvolvimento da doença. **Objetivo:** Investigar a presença de anticorpos anti EBV e a expressão de HERV-W em pacientes com EM e avaliar a correlação entre a atividade clínica e imagiológica da EM com a avaliação quantitativa do HERV-W e EBV. **Métodos:** Realizamos avaliações clínicas e de ressonância magnética (RM) por 36 meses de 36 pacientes com EM e a comparamos com a análise quantitativa longitudinal do PCR em tempo real do RNA do HERV-W em PBMC e uma análise transversal por ELISA do anti VCA IgG e IgM de EBV. Foram utilizados dois grupos controles sendo o primeiro com 30 indivíduos saudáveis e o segundo com 26 pacientes com outras doenças neurológicas (ODN) para comparação com os títulos de HERV-W e anti- EBV. **Resultados:** A dosagem do IgG EBV foi estatisticamente maior no grupo EM quando comparado ao grupo controle saudável ($p = 0,024$) e a expressão de HERV-W foi estatisticamente maior tanto no grupo EM ($p = 0,001$) como no grupo ODN ($p = 0,022$) quando comparados com os controles saudáveis nos grupos de pacientes. Nenhuma sorologia IgM do EBV foi positiva. A avaliação longitudinal da expressão relativa do HERV-W não apresentou correlação com nenhum dos parâmetros clínicos ou imagiológicos de avaliação da EM sendo eles: tipo de EM; medicamento em uso; EDSS; taxa anualizada de surtos; novas lesões em T2/FLAIR pela RM; lesões captando gadolínio pela RM. **Conclusão:** Existe uma expressão relativa de HERV-W aumentada em pacientes com EM e em ODN quando comparados com controles saudáveis. Os pacientes com EM apresentam valores superiores de anticorpos IgG anti- EBV. Não encontramos nenhuma correlação na avaliação longitudinal entre a atividade clínica e imagiológica de pacientes com EM e a avaliação quantitativa do HERV-W e do anticorpo anti-EBV.

Palavras-Chave: Esclerose Múltipla. Retroviridae. Herpesviridae.

Olival GS. Comparison between clinical and MRI multiple sclerosis activity and expression of human endogenous retrovirus type W [thesis]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

ABSTRACT

Introduction: Multiple sclerosis (MS) is a demyelinating autoimmune inflammatory disease. Several studies have demonstrated the strong association between MS and the expression of endogenous retrovirus W (HERV-W) and Epstein Barr Virus (EBV), without defining its true role in the development of the disease. **Objective:** To investigate the presence of anti-EBV antibodies and HERV-W expression in MS patients and to evaluate the correlation between the clinical and imaging activity of MS with the quantitative evaluation of HERV-W and EBV. **Method:** We performed clinical and magnetic resonance imaging (MRI) evaluations for 36 months of 36 MS patients and compared it with the longitudinal quantitative real-time PCR analysis of HERV-W RNA in PBMC and a cross-sectional analysis by anti-VCA IgG and EBV IgM ELISA. Two control groups were used, the first with 30 healthy subjects and the second with 26 patients with other neurological diseases (OND) for comparison with HERV-W and anti-EBV titers. **Results:** IgG EBV was statistically higher in the MS group when compared to the healthy control group ($p = 0.024$). HERV-W expression was statistically higher in the MS group ($p = 0.001$) and the OND group ($p = 0.022$) when compared to healthy controls. No IgM EBV serology was positive. The longitudinal evaluation of the relative expression of HERV-W did not present any correlation with the clinical or MRI of the MS group following parameters: type of MS; medication in use; EDSS; annualized rate of relapses; new MRI T2/FLAIR lesions; MRI gadolinium enhancing lesions. **Conclusion:** There is a relative increased HERV-W expression in patients with MS and in OND when compared with healthy controls. Patients with MS have higher values of anti-EBV IgG antibodies. We found no correlation in the longitudinal evaluation between the clinical and imaging activity of MS with the quantitative evaluation of HERV-W and the anti-EBV antibody.

KEYWORDS: Multiple Sclerosis. Retroviridae. Herpesviridae.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CATEM-	Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla da Santa Casa
CIS-	Síndrome Clínica Isolada
Cluster-TIC-	Síndrome Cefálea em salvas com neuralgia do trigêmeo
DIS-	Disseminação do espaço
DIT-	Disseminação no tempo
EAE-	Encefalomielite autoimune experimental
EBV-	Vírus Epstein-Barr
EDSS-	Escala expandida de estado de incapacidade de Kurtzke
EM-	esclerose múltipla
EMPP-	Esclerose múltipla primária-progressiva
EMPR-	Esclerose múltipla progressiva-recidivante
EMRR-	Esclerose múltipla remitente-recorrente
EMSP-	Esclerose múltipla secundária-progressiva
Gd-	Gadolínio
GNbAC1-	Anticorpo monoclonal humanizado contra o <i>env</i> do HERV-W
HERV-	retrovírus endógeno humano
HERV-W-	retrovírus endógeno humano da família W
IL-	Interleucina
IMT-SP-	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
ISCMSP-	Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
LCR-	Líquido cefalorraquidiano
MHC-	Complexo de histocompatibilidade principal
MI-	Mononucleose infecciosa
miRNA-	Micro-RNA
MOG-	Glicoproteína de oligodendrócito da mielina
MSRV-	Multiple sclerosis associated retrovirus
MSRV-env	Proteína do envelope do MSRV
ODN-	Grupo controle com outras doenças neurológicas
OMS-	Organização Mundial da Saúde
PDIC-	Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica
PBMC-	Células mononucleadas do sangue periférico
RIS-	Síndrome Radiológica Isolada
RNM-	Ressonância Nuclear Magnética
SNC-	Sistema Nervoso Central
SUNCT-	Cefaleia neuralgiforme com hiperemia conjuntival e lacrimejamento
SUS-	Sistema Único de Saúde
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Th-	T <i>helper</i>
VCA-	antígeno do capsídeo viral

Lista de figuras

Figura 1. Imagem da medula e fossa posterior com múltiplas lesões em diferentes idades registradas por Robert Carswell em seu atlas [6].	11
Figura 2. Ilustração privada mostrando o faraó Tutancâmon sobre sua bengala com sua esposa Ankhensanamun. Fonte: Hawass, 2010 [10]	12
Figura 3. Prevalência Global da Esclerose Múltipla em 2013 [19]......	15
Figura 4. Atlas da idade média do início da esclerose múltipla, em anos [17].	16
Figura 5. A evolução clínica das diferentes formas de EM.....	18
Figura 6. Boxplot mostrando a comparação entre os títulos de IgG EBV entre controles saudáveis, controle outras doenças neurológicas e pacientes EM.....	52
Figura 7. Comparação entre os grupos EM, Indivíduos Saudáveis (Controle) e Outras doenças neurológicas (ODN) segundo a expressão do HERV-W analisada através do <i>fold change</i>	53
Figura 8. Perfil de expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) ao longo do seguimento - com ou sem alteração na RM T2.....	56
Figura 9. Perfil de expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) ao longo do seguimento – com ou sem alteração na RM Gd:	56
Figura 10. Perfil de expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) ao longo do seguimento – com ou sem surtos.	57
Figura 11. Perfil de expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) ao longo do seguimento – com ou sem piora no EDSS.....	57
Figura 12. Perfil de expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) ao longo do seguimento – com ou sem alteração em algum dos critérios.....	58

Lista de tabelas

Tabela 1. Os critérios diagnósticos revisados 2010 de McDonalds de EM.....	22
Tabela 2. <i>Primers</i> utilizados.....	44
Tabela 3. Descrição das características pessoais e informações clínicas dos pacientes EM...	49
Tabela 4. Diagnósticos das doenças dos pacientes no grupo outras doenças neurológicas	50
Tabela 5. Descrição das características avaliadas segundo grupos e resultado dos testes estatísticos.....	51
Tabela 6. Resultado das comparações múltiplas entre os grupos para as características que diferiram entre eles.	51
Tabela 7. Descrição da dosagem do IgG EBV e da expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) basal segundo os subgrupos de doenças dentre o ODN e resultado dos testes comparativos.....	53
Tabela 8. Descrição das características de evolução da doença durante o seguimento.....	54
Tabela 9. Descrição da expressão do HERV-W (<i>fold change</i>) basal segundo cada característica de interesse e resultado dos testes comparativos e correlação com idade e tempo de doença nos pacientes EM.....	55
Tabela 10. Descrição do <i>fold change</i> do HERV-W segundo evolução pelos critérios adotados e ao longo do seguimento e resultado dos testes comparativos.....	59

Sumário

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Esclerose Múltipla.....	10
1.1.1 Conceitos gerais.....	10
1.1.2 Aspectos históricos	10
1.1.3 A distribuição da esclerose múltipla.....	13
1.1.4 Formas clínicas da EM	17
1.1.5 Diagnóstico da EM	19
1.2 Imunopatogênese	23
1.2.1 Fatores Genéticos	26
1.2.2 Fatores Epigenéticos.....	27
1.2.3 Outros fatores ambientais: vitamina D e cigarro.	29
1.2.4 Modulação imunológica pela microbiota intestinal na EM.....	29
1.3 Etiologia Viral	30
1.4 Vírus Epstein Barr	32
1.4.1 Conceitos gerais sobre o EBV	32
1.4.2 A associação entre o EBV e a EM.....	33
1.5 Os retrovírus endógenos humanos da família W e a EM.....	35
1.6 EM e o uso de medicamentos com efeitos antivirais	37
1.7 Associação entre EBV, HERV-W e EM.....	38
1.8 Justificativa.....	39
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Primário	40
2.2 Objetivos Secundários.....	40
3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Seleção da amostra.....	41
3.2 Coleta e envio do material.....	42
3.3 Análise laboratorial	43
3.3.1 Sorologia para o vírus EBV	43
3.3.2 Análises Moleculares.....	43
3.4 Análise de atividade clínica e imagiológica da doença	44
3.5 Análise estatística	45
3.5.1 Parâmetros analisados.....	45
3.5.2 Testes estatísticos	46
4 RESULTADOS	48
5 DISCUSSÃO	60
5.1 O pareamento entre os grupos.....	60
5.2 A presença do HERV-W em pacientes com EM e em outras doenças.....	61
5.3 A presença de infecção prévia pelo EBV e seus títulos de anticorpo	65
5.4 Marcadores de atividade de doença	66
5.5 Outros fatores associados	68
5.6 Considerações finais.....	68
6 REFERÊNCIAS	71
7 ANEXOS.....	88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose Múltipla

1.1.1 Conceitos gerais

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória degenerativa do sistema nervoso central (SNC) que envolve aspectos imunológicos, ambientais e genéticos. A doença é crônica, sem cura conhecida até o momento, e inicia, na maioria das vezes, durante a juventude ou fase adulta, sendo uma das principais causas de incapacidade neurológica em adultos jovens no mundo todo. Essa é uma doença que impacta na vida dos pacientes que a possuem e seus familiares, com consequências físicas, psíquicas, sociais e espirituais.

A EM é uma doença que compromete o cérebro, o tronco encefálico, o cerebelo e a medula espinhal. A heterogeneidade clínica da EM é bem descrita, mas atualmente sabe-se que as lesões de EM e os mecanismos subjacentes envolvidos na destruição patológica do sistema nervoso central são também heterogêneos. É uma doença multifatorial, em que é sugerido um mecanismo imunopatogênico como responsável pela destruição da bainha de mielina^{1,2,3}.

1.1.2 Aspectos históricos

Jean-Martin Charcot, grande neurologista do século XIX, foi quem definiu as bases clínico patológicas da doença que descreveu como *sclérose en plaque disséminée* (esclerose em placas disseminadas, do francês) como sendo uma entidade separada da paralisia e da *paralysys agitans* - nome na época, da doença conhecida hoje como doença de Parkinson. Suas observações decorreram da comparação da história clínica durante a vida com as avaliações de autópsias de pacientes com tremor e paralisia que mostraram a presença de placas acinzentadas espalhadas pela coluna espinhal, tronco encefálico e cérebro. Charcot cunhou nesse momento paradigmas utilizados até hoje para o diagnóstico da doença através de suas correlações anátomo-clínicas relacionando as placas visualizadas com lesões disseminadas no tempo e espaço, manifestando-se clinicamente com períodos de agudização e remissão, com predomínio de lesão na mielina, especialmente na região periventricular, nervo óptico e medula espinhal⁴.

Antes de Charcot realizar suas considerações anátomo clínicas, a primeiro espécime anátomo patológica da doença foi ilustrada por Jean Cruveilhier, professor de anatomia patológica da Universidade de Paris, descrevendo em um atlas placas marrons em pacientes com múltiplas lesões neurológicas, e o próprio Charcot atribui a ele o mérito das primeiras

ilustrações registradas a partir de necropsias realizadas entre 1835 e 1842, entretanto só publicadas em 1841⁵.

Sir Robert Carswell, professor de anatomia patológica na University College, de Londres, foi quem publicou um atlas em 1838 no qual realizou a ilustração diretamente em pedra litográfica a partir de necropsia que inicialmente descreveu como sendo lesões inexplicáveis na medula: “um estado doente peculiar da coluna e ponte de Varolii, acompanhada de atrofia e porções sem coloração” (Figura 1)⁶. Pode se notar pela imagem que há lesões com diferentes colorações que sugerem a presença de lesões antigas e outras mais recentes, caracterizando uma disseminação temporal da doença.

Figura 1- Imagem da medula e fossa posterior com múltiplas lesões em diferentes idades registradas por Robert Carswell em seu atlas⁶.

Além desses estudiosos, cabe citar Friederich Theodor von Frerichs que, em 1849, na Alemanha, correlacionou lesões patológicas com achados clínicos e observou que se tratava de uma doença que acometia jovens, de progressão lenta e com caráter recorrente. Valentiner, em 1856, descreveu dois casos com episódios remitentes recorrentes de sintomas neurológicos. Eduard Rindfleisch observou, em 1863, a tendência das lesões perivasculares, que influenciam os conceitos sobre patogênese da doença até hoje. Moreira também descreveu as características histológicas de desmielinização e astrocitose dos achados do final do século XIX, conforme proposto por Frommann^{7,8}.

Naturalmente que antes dessas descrições, há relatos em todas as sociedades de doenças em jovens que cursavam com paresia, parestesia, ataxia e alteração visual, com evolução em períodos de remissão ou progressivamente, sem ser possível determinar quando foram os primeiros pacientes acometidos pela doença na humanidade.

O faraó Tutancâmon do Egito Antigo, famoso monarca do período 1336 a 1327 a.C. é um dos casos amplamente registrados através de ilustrações do uso de bengalas desde a idade jovem⁹. Sem poder afirmar que a EM iniciou-se no Egito, trago apenas à reflexão de que as dificuldades de pacientes jovens com incapacidades que vivemos em nossa sociedade hoje, sempre existiram, entretanto, apenas a ciência observacional pôde compilar e categorizar esses problemas em doenças diferentes. (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração privada mostrando o faraó Tutancâmon sobre sua bengala com sua esposa Ankhesanamun. Fonte: Hawass¹⁰.

Os relatos que apontam para o primeiro caso provável de EM documentado por escrito foram da Santa Lidwina de Schiedam. Através da compilação de documentos necessários para a canonização de Santa Lidwina, Madaer, em 1979¹¹ avaliou os documentos referentes a sua biografia guardados pela Igreja. Maeder cita uma carta escrita em 1421 por Jan van Bieren, conde da Holanda, relatando às autoridades locais sobre a “estranha doença” da virgem Lidwina.

Lidwina, nascida em Schiedam, no sul da Holanda em abril de 1380, tem registrados ricos relatos sobre os 37 anos de sua doença, que se iniciou aos 16 anos de idade, e evoluiu com paralisia de ambas pernas, braço direito, paralisia facial, diminuição da visão, transtorno da sensibilidade e disfagia. Lidwina foi canonizada pois apresentava melhora dos sintomas neurológicos após períodos de oração e jejum¹¹.

Além de Lidwina de Schiedam, há também a história de sir Augustus Frederick d’Este, neto do rei George III da Inglaterra, sobrinho da rainha Vitória, que viveu entre 1749 e 1848 e relatou ricamente em seu diário 25 anos de doença com sintomas recorrentes de perda visual, alteração do equilíbrio, parestesias e paralisias¹².

A primeira descrição da doença no Brasil foi feita em 1923, no estado de Pernambuco, por Aluizio Marques. A paciente apresentava sintomas de formas clássicas da EM, como nistagmo, fala escandida, tremor intencional e paralisia espástica¹³.

Desde então, outros grandes marcos históricos brasileiros no tratamento da EM foram a introdução, em 1993, da primeira medicação que modificava a história natural da doença; depois, em 1997, quando o Ministério da Saúde aprovou a dispensação dos imunomoduladores através do Sistema Único de Saúde (SUS), permitindo que toda a população em território brasileiro tivesse acesso ao tratamento¹⁴. A Portaria nº 97, de 22 de março de 2001, recomendou a criação de Centros de Referência nos diversos Estados, sob a supervisão do Secretário de Saúde de cada região, o que levou a organização atual da maior parcela de atendimento da população brasileira com a doença¹⁵.

1.1.3 A distribuição da esclerose múltipla

A EM é uma doença cuja etiologia ainda não está completamente elucidada. A avaliação da variação de sua frequência dependendo da idade, sexo e região são essenciais para a formulação de hipóteses dos agentes causais e desencadeantes. A avaliação da distribuição global da doença auxilia na busca por explicações sobre a origem da doença e também na correta alocação de recursos de saúde pública, baseado na incidência cumulativa e a prevalência da enfermidade.

Os estudos epidemiológicos sobre a EM são bastante desafiadores. Em primeiro lugar, a EM é difícil de ser diagnosticada. Não existe um teste único e indubitável que define a doença, o que pode levar a um diagnóstico incorreto ou atrasado. Outro fator que contribuiu historicamente para essa morosidade está no fato de que houve diferentes critérios para diagnóstico utilizados ao longo do tempo, como veremos a seguir.

Na grande maioria dos países, não é uma doença de notificação compulsória. Além disso são poucas as regiões do mundo em que há informações médicas centralizadas em um único sistema de saúde. A maioria das pesquisas é feita a partir da avaliação sistemática dos hospitais e clínicas onde os pacientes com sintomas suspeitos são atendidos. A pulverização desses centros pode ser outro problema para os estudos. Também não há uma unificação na estratégia para análise dos dados dos diferentes estudos epidemiológicos realizados no mundo¹⁶.

Com o objetivo de sistematizar a avaliação epidemiológica da EM, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza estudos de normatização desses dados no mundo todo periodicamente^{17,18,19}.

O número estimado de pessoas com EM ao redor do mundo é de 2.3 milhões¹⁸. A mediana da prevalência estimada da doença é de 30 para 100.000 habitantes (variando entre 5-80) e a mediana da incidência estimada é de 2.5 para 100.000 habitantes por ano (variando entre 1.1- 4). A variação entre regiões do mundo traz a Europa com as maiores taxas, seguida pelo leste do mediterrâneo, América, Ásia e África¹⁷ (Figura 3).

Apesar de muito significativos esses estudos apresentam limitações, tais quais o fato de que 67 dos 112 países avaliados apresentavam como fonte de informações, um único grupo do país. Além disso, 31% dos países estudados afirmam realizar o diagnóstico da doença sem o uso do exame de ressonância magnética¹⁷. Portanto, é essencial a compreensão de que se tratam de dados estimados. Apesar dessas barreiras e das diversas questões que permanecem em aberto, poucos estudos colaboraram tanto para compreensão da doença como os de distribuição.

Figura 3 - Prevalência Global da Esclerose Múltipla em 2013¹⁹.

De modo geral existe uma relação entre risco da doença e a região longitudinal, sendo mais comum em pessoas que vivem mais distante da linha do Equador²⁰. Existem grupos étnicos que são exceção a essa observação, apresentando baixo risco apesar de estarem localizadas em regiões distantes da linha do Equador, como: os Samis - da região escandinava; os Ameríndios; os Huterites - da região canadense; os Maoris - na Nova Zelândia; e Inuites - também conhecidos como esquimós. Também existem populações com alto risco, próximos da região do Equador como: os Sardos, os Sicilianos, os Palestinos e os Parsis - comunidade na Índia²¹⁻²³.

A razão pela qual esses grupos fogem à regra é desconhecida, mas vale ressaltar que todos esses grupos apresentam isolamento genético. Discutiremos a seguir como os fatores genéticos e ambientais se entrelaçam no desenvolvimento da doença.

Diversas teorias têm sido apresentadas para explicar a diferença no risco do desenvolvimento da doença nas diferentes regiões do globo. A hipótese de que a diminuição da exposição a luz solar age indiretamente na imunologia do paciente através de menores taxas de produção de vitamina D foi apresentada diversas vezes²⁴⁻²⁷.

Uma revisão sistemática também correlacionou o risco do desenvolvimento da doença com os meses do ano, mostrando que, no hemisfério Norte, é maior o risco de desenvolver EM em pessoas que nasceram nos meses de abril e maio e menor o risco para os que nasceram nos meses de outubro e novembro, o que leva a hipótese de que a exposição a raios ultravioleta e os níveis de vitamina D influenciam o risco do desenvolvimento da doença²⁸.

Um estudo clássico sobre migração realizado por Alter, em Israel, mostra que a região onde o paciente passou os primeiros 15 anos de vida influencia, de maneira mais contundente, o risco do desenvolvimento da doença e mesmo em caso de migração do paciente após essa idade, o risco do seu país de origem é mantido²⁹. Esse estudo apesar de ter como foco o risco geográfico é também um dos pilares que sustentam a importância dos agentes ambientais, especialmente durante a formação do sistema imunológico do paciente.

Apesar de os fatores desde a fase gestacional até a adolescência influenciarem no risco da doença, o interquartil para o início do desenvolvimento dos sintomas da EM varia entre 25,3 e 31,8 anos, com a idade média de 29,2 anos. Apesar de haver alguma variação na idade média de início da doença entre as regiões do mundo, ela se mantém entre 25 e 35 anos (Figura 4). A doença se desenvolve em caráter de exceção na infância e após os 50 anos³⁰.

Figura 4 - Atlas da idade média do início da esclerose múltipla, em anos¹⁷.

Semelhante às várias doenças autoimunes, a EM é mais comum em mulheres. Essa observação levou a diversas investigações envolvendo as diferenças sobre o sistema imune e/ou o sistema nervoso central entre mulheres e homens, que podem ser causadas por efeito dos hormônios sexuais, por diferenças genéticas ou por hábitos de vida distintos, levando à exposição ambiental que poderia explicar esse fenômeno³¹.

Globalmente a taxa estimada de feminino/masculino era de 2:1 em 2008¹⁷, mas diversos estudos têm indicado uma tendência de aumento dessa taxa ao longo dessa última década, atingindo 3,4:1^{32,33}. O aumento da taxa do risco da doença em mulheres pode refletir alterações ambientais, nutricionais ou de hábitos de vida modernos, como sugerido por Celius, que o aumento de fumantes mulheres, entre outros, pode influenciar essa incidência a partir de seu estudo realizado em Oslo³⁴. Os dados sobre a taxa de incidência nas formas progressivas são contraditórios, alguns estudos mostram queda dessa taxa³⁵ enquanto outros não comprovam esse dado³⁶.

1.1.4 Formas clínicas da EM

Desde o início do estudo da EM, percebeu-se que a doença apresentava características clínicas extremamente variáveis e prognóstico imprevisível individualmente. Um conhecimento detalhado do curso geral e do prognóstico é, portanto, desejável para o médico que deseja compreender a doença e torná-la compreensível para o paciente e sua família. Nesse contexto categorizar a EM em subtipos clínicos ou fenótipos fornece uma linguagem comum para descrever a variedade de cursos clínicos da EM e realizar estudos de prognóstico e eficácia de tratamentos. Outra importância da divisão em formas clínicas é que isso permite critérios de inclusão mais específicos em pesquisas e quanto mais homogênea a população do estudo, menos pacientes são necessários para demonstrar os benefícios de um determinado medicamento.

A partir desse entendimento realizou-se um consenso em 1996 de especialistas em EM, em que se identificou e definiu quatro subtipos de EM: remitente-recorrente (EMRR), secundária-progressiva (EMSP), primária-progressiva (EMPP) e progressiva-recidivante (EMPR). Esses quatro subtipos orientaram a pesquisa e a prática clínica da EM por muitos anos³⁷.

A EMRR responde pela maioria dos casos de EM no início e caracteriza-se por ataques de desmielinização no SNC que levam a sintoma neurológico de instalação subaguda. Após apresentar o surto da doença o paciente pode ter recuperação completa ou parcial dos sintomas e durante as semanas ou meses seguintes. Entre os episódios, os pacientes permanecem neurologicamente estáveis. A EMPP responde por cerca de 15% dos casos iniciais. Tais pacientes não manifestam episódios, mas sim um acúmulo de incapacidade neurológica constante desde o início da doença. Em comparação com a EMRR a doença começa em uma idade maior (idade média de 40 anos) e a incapacidade aparece mais rápido. A EMSP sempre começa como EMRR e em algum momento sua evolução clínica muda, de

modo que o paciente apresenta deterioração constante da função sem episódios agudos. A EMSP produz maior grau de deficiência neurológica fixa do que a EMRR. Para um paciente com EMRR, o risco de apresentar EMSP é de cerca de 2% por ano. A literatura, até 2013, também admitia uma forma EMPP que se superpõe à EMPP e EMSP. A exemplo daqueles com EMPP, estes pacientes apresentam deterioração constante do seu estado desde o início da doença. Contudo, assim como aqueles com EMPS, eles apresentam episódios eventuais superpostos à sua evolução progressiva³⁷. Na Figura 5 podemos ver graficamente como ocorre a evolução da incapacidade neurológica dos pacientes ao longo do tempo nas diferentes formas da doença.

Figura 5- A evolução clínica das diferentes formas de EM.

Mais recentemente, em 2013 o Comitê de aconselhamento em estudos clínicos de EM publicou uma proposta com algumas novas sugestões e modificações. A mudança proposta nos subtipos de EM por Lublin *et al.*³⁸ muda o quadro para considerar os cursos clínicos como EM Recidivante ou EM Progressiva, e recomenda sempre pensar na atual estabilidade da doença. Assim, “Ativo” descreve recaídas (surtos clínicos e / ou atividade de ressonância magnética) e “Progressão” descreve deterioração clínica. Tanto a EMSP quanto a EMPP se enquadram na categoria de EM Progressiva, por esse critério.

Portanto, por essa nova proposta os pacientes podem apresentar: 1) EM Recidivante Ativa: com recidivas ou novas lesões na ressonância magnética ou; 2) EM não ativa: sem recaídas ou atividade de ressonância magnética; também pode ser o caso a 3) EM progressiva

(EMSP e EMPP): Ativa com progressão (recaídas ou atividade de ressonância magnética e deterioração clínica não devido a recaídas); 4) EM progressiva (EMSP e EMPP) ativa: mas sem progressão, na qual apresenta recidivas, mas sem deterioração clínica; 5) EM progressiva (EMSP e EMPP) não ativa: mas com progressão ou também; 6) EM progressiva (EMSP e EMPP) não ativa: e sem progressão (doença estável).

Nessa proposição de critérios foram incluídas também a Síndrome Clínica Isolada (CIS), que se trata da situação na qual o paciente apresentou um único evento desmielinizante e não preenche os critérios para EM; e síndrome radiológica isolada (RIS) que são pacientes com um achado incidental de lesões pela ressonância magnética (RM) sem ter apresentado nenhum surto clínico da doença e não preenche critérios para EM³⁸.

Em nosso estudo utilizaremos os termos EMRR, EMPP e EMSP, que são os que utilizamos no atendimento do dia-a-dia do ambulatório.

1.1.5 Diagnóstico da EM

Desde o início da descrição da doença houve esforços na tentativa de unificar os critérios diagnósticos da EM. O objetivo principal de definir critérios para o diagnóstico era uniformizar os critérios de inclusão dos pacientes nos estudos clínicos, mantendo a melhor sensibilidade e especificidade o possível.

Podemos citar diversos critérios que foram propostos sendo que o primeiro que teve notoriedade foi conhecido por critérios de Schumacher. Esses conceitos foram cunhados em uma reunião presidida por Schumacher em 1965³⁹ e foram compilados por Kutzke em 1974⁴⁰ contendo os seguintes critérios:

- a) O exame neurológico deveria revelar alterações objetivas que pudessem ser atribuídas a lesão SNC;
- b) O exame neurológico ou a história clínica deveriam indicar lesão de duas ou mais áreas do SNC;
- c) A evidência de doença do SNC deveria apontar para lesões predominantes na substância branca;
- d) A evolução temporal das lesões no SNC deveria seguir um dos dois padrões seguintes:
 - Dois ou mais episódios de piora, cada um com duração igual ou superior a 24 horas e com intervalos não inferiores a 30 dias;
 - Progressão lenta e gradativa dos sintomas neurológicos durante um período mínimo de 6 meses;

- e) As primeiras manifestações da doença deveriam ocorrer entre os 10 e os 50 anos de idade;
- f) Ausência de outro diagnóstico neurológico mais provável.

Os critérios que ficaram conhecidos como critérios de Schumacher, apresentaram algumas limitações e outros foram sendo propostos como os critérios de Rose de 1976⁴¹ e os critérios de Bauer de 1978⁴². Entretanto a definição de surto como uma piora dos sintomas durando mais de 24 horas e separados por pelo menos 30 dias dos últimos sintomas são usados na prática e nos protocolos até atualmente. Por outro lado, a definição de cortes rígidos de idade para o diagnóstico é inapropriada e na era moderna com o uso da RM, tanto EM pediátrica quanto EM de início tardio são mais facilmente diferenciados de outras etiologias mais comuns nessa faixa etária. Também o item descrito acima, que coloca como nenhuma explicação melhor para os sintomas, tem sido muito criticado ao longo do tempo por ser muito amplo, mas pela própria característica da EM e pela quantidade de diagnósticos diferenciais, foi mantida nos critérios até atualmente nas definições mais modernas.

A comunidade científica seguiu usando os critérios de Schumacher até 1983, quando Charles Poser propõe novos critérios a partir de uma reunião realizada em 26 e 27 de abril de 1982 em Washington com os estudiosos dos EUA e Canadá do assunto no *Workshop on the Diagnosis of Multiple Sclerosis*. Os chamados critérios de Poser⁴³ reafirmaram alguns conceitos como:

- a) Surto: Sintoma de disfunção neurológica por mais de 24 horas;
- b) Evidência clínica: disfunção neurológica demonstrável em exame neurológico;
- c) Evidência paraclínica: demonstração de outros exames não clínicos para existência de uma lesão no SNC.

E a partir desses conceitos definia as seguintes conclusões diagnósticas:

- a) EM clinicamente definida: 2 ou mais surtos e uma evidência clínica ou paraclínica
- b) EM definida auxiliada por laboratório: 1 ou mais surtos e bandas oligoclonais positivas no liquor, com evidências clínicas e paraclínicas;
- c) EM provável clínica: pelo menos 1 surto e evidências clínicas ou paraclínicas;
- d) EM provável auxiliada por laboratório: apenas 2 surtos são necessários para essa categoria;
- e) Ausência de EM: nenhuma evidência clínica da presença de EM.

Os critérios de Poser trouxeram alguns conceitos importantes e estruturaram a essência dos critérios subsequentes ao resgatar os conceitos que o próprio Charcot já trazia, de

que para o diagnóstico de EM é essencial a disseminação no tempo (DIT) e disseminação do espaço (DIS) das lesões.

De fato, a era pré-RM trazia muitos desafios para o diagnóstico da EM e as chamadas evidências paraclínicas dos critérios de Poser foram os primeiros a incorporar essa nascente modalidade diagnóstica. Na época, porém, o conhecimento permitiu apenas que as alterações de RM fossem incorporadas juntamente com tomografia computadorizada de crânio, teste de hipertermia, potencial evocado e avaliação urodinâmica.

Em 1988, houve as definições por RM nos chamados critérios de Paty⁴⁴ e critérios de Fazekas⁴⁵; mas foi somente quando Barkhof⁴⁶ publica um artigo no qual mostra alguns critérios de RM que permitem acurácia estatística para definir EM clinicamente definida, logo na primeira apresentação da doença, que houve uma unificação dos critérios utilizados nos artigos científicos.

Os critérios de Barkhof, foram posteriormente modificados por Tintoré em 2000⁴⁷, e os chamados critérios de Barkhof-Tintoré tiveram uma importância histórica por definir as bases de análise de ressonância usadas nos critérios de McDonalds. Esse critério recebeu esse nome a partir do neurologista W. Ian McDonald que presidiu um Painel Internacional em associação com a *National Multiple Sclerosis Society of America* e recomendou os novos critérios em abril de 2001⁴⁸. Esse critério foi revisado em 2005⁴⁹, 2010⁵⁰ e em 2017⁵¹.

Os critérios de McDonald mantiveram a proposta do diagnóstico de EM baseada puramente em sintomas clínicos, mas propôs que os achados da RM poderiam preencher a DIT e DIS necessárias para o diagnóstico. A partir dessa modificação esses critérios permitiam o diagnóstico mais precoce a partir de um único surto, aumentando a sensibilidade sem comprometer a especificidade dos critérios prévios.

Em nosso estudo utilizamos os critérios de McDonald de 2010 cujo resumo está na Tabela 1.

Tabela 1- Os critérios diagnósticos revisados 2010 de McDonald de EM.

Apresentação Clínica	Dados adicionais para o diagnóstico
<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 surtos • Evidência clínica de ≥ 2 lesões ou evidência clínica de 1 lesão com evidência por anamnese de surto prévio; 	nenhum
<ul style="list-style-type: none"> • ≥ 2 surtos • Evidência clínica de 1 lesão 	Disseminação espacial demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 lesão T2 em pelo menos 2 de 4 regiões típicas de EM no CNS (periventricular, justacortical, infratentorial, ou medula espinhal); • Aguardar novo surto com topografia diferente
<ul style="list-style-type: none"> • 1 surto • Evidência clínica de ≥ 2 lesões 	Disseminação no tempo demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> • Presença simultânea de lesões assintomáticas captantes e não captantes de Gadolínio (Gd);ou • Nova lesão em T2 e/ou presença de lesões captantes de Gd em RM de seguimento realizada em qualquer altura e comparada com a RM de base; ou • Aguardar pela ocorrência do 2º surto
<ul style="list-style-type: none"> • 1 surto • Evidência clínica de uma lesão (CIS) 	Disseminação no espaço e no tempo, demonstrada por: No espaço: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 lesão T2 em pelo menos 2 de 4 regiões típicas de EM no CNS (periventricular, justacortical, infratentorial, ou na medula espinhal); ou • Aguardar pela ocorrência de um surto que afete uma área diferente no SNC; e No tempo: <ul style="list-style-type: none"> • Presença simultânea de lesões assintomáticas captantes e não captantes de Gd;ou • Nova lesão em T2 e/ou presença de lesões captantes de Gd em RM de seguimento realizada em qualquer altura e comparada com a RM de base; ou • Aguardar pela ocorrência do 2º surto

Continua

Continuação

<ul style="list-style-type: none">Progressão neurológica insidiosa sugestiva de EM (EMPP)	<p>1 ano de progressão de doença (retro e prospectivamente determinada) mais 2 de 3 dos seguintes critérios:</p> <ul style="list-style-type: none">Evidência de disseminação espacial no cérebro, com base em ≥ 1 lesão em T2, nas regiões típicas de EM(periventricular, justacortical ou infratentorial);Evidência de disseminação espacial na medula espinhal, com base em ≥ 2 lesões em T2 na medula espinhalEvidência de bandas oligoclonais por focalização isoelétrica e/ou aumento do índice IgG
---	--

Em 2018⁵¹, foi publicada nova revisão dos critérios, com pequenas modificações nas quais: 1) a presença das bandas oligoclonais no líquido cefalorraquidiano (LCR) pode servir para demonstrar DIT; 2). Ambas lesões sintomáticas e assintomáticas podem ser consideradas na determinação de DIS e DIT; e 3) Lesões corticais foram adicionadas às lesões justacorticais para determinação de DIS.

Todos os pacientes que preenchiam os critérios anteriores continuam com o diagnóstico de EM, portanto, a atualização do critério não modifica a validade do presente estudo.

1.2 Imunopatogênese

A maioria das evidências sobre a etiologia da EM apontam que ela seja uma doença autoimune causada por uma conjuntura de fatores genéticos, influência viral e fatores ambientais. Aparentemente é necessária uma suscetibilidade genética que somada a fatores epigenéticos, são influenciados por infecções virais e fatores ambientais. Todos esses elementos são modulados no sistema imunológico que conversa continuamente com a microbiota intestinal e produz uma disfunção imunológica, que leva nosso organismo a destruir as próprias células. No caso da EM, mais especificamente, dentro do SNC.

No entanto, a patologia inflamatória comum das lesões da EM sugere que as respostas autoimunes específicas contra os componentes da mielina do SNC podem ter um papel crucial na destruição da mielina. Este conceito é apoiado pelo elevado nível de imunoglobulina oligoclonal no fluido cerebrospinal, pela ligação genética com o locus do complexo de

histocompatibilidade principal (MHC), expansão de células B e T reativas à mielina dentro de lesões de EM e o fato de que a imunização com as proteínas de mielina induz uma doença semelhante a EM em animais, a encefalomielite autoimune experimental (EAE)⁵².

Estudos sobre a imunopatogênese da EM em modelos animais demonstram que células T autoreativas (CD4+ ou CD8+) podem resultar em desmielinização inflamatória também sustentam a teoria de que a EM é uma doença imunomediada envolvendo um ou mais antígenos localizados na bainha de mielina do SNC⁵³. Até recentemente a EM foi considerada uma doença T-CD4+ mediada, devido aos achados da EAE. Considera-se que as doenças autoimunes, como a EM, são mediadas por linfócitos T *helper* (Th) do tipo 1 produtores de Interferon Gama e em menor quantidade interleucina (IL) 4⁵⁴. Alternativamente, linfócitos CD4+ Th do tipo 2 representa uma população antinflamatória de linfócitos que produz grande quantidade de citocinas imunoregulatórias, em especial IL4 e IL5. Inicialmente foi pensado que os Th1, Th2 e Th17 com citocinas características, seriam os principais condutores do processo autoimune da EM. Porém o tratamento com o anticorpo monoclonal Ustekinumab, que bloqueia a interleucina 12, a citocina que é o pivô na diferenciação em Th1 não mostrou benefício na fase dois dos ensaios clínicos⁵⁵.

Mais recentemente descobriu-se que as células T CD8+ são potenciais participantes ativos na patogênese da EM⁵⁶. Nas placas da EM, células T CD8+ excedem células T CD4+ e exibem expansão oligoclonal nas placas⁵⁷ e no líquido de pacientes com EM. Células T isoladas do sangue periférico ou do LCR de pacientes com EM mostraram um enriquecimento seletivo das células T CD8+ de memória com expansão oligoclonal, sugerindo que estas células são ativadas e dirigidas a antígenos⁵⁸. Estudo de corte desenvolvido por Jilek e colaboradores em 2008 mostrou que houve maior resposta de células T CD8+ específica para EBV e interferon gama mediada em pacientes com CIS comparados a pacientes com todas as outras formas de EM, com outras doenças neurológicas e participantes controles⁵⁹.

Tradicionalmente as células B são implicadas na EM através da sua capacidade de produzir anticorpos patogênicos ou autoanticorpos que podem causar destruição tecidual e recrutamento de macrófagos que expressam o receptor Fc e por ativação das vias do complemento. Achados de análise histopatológica indicam que anticorpos podem ter importante papel na iniciação⁶⁰ da placa e na desmielinização em pacientes com EM estabelecida⁶¹.

Quanto a fisiopatologia imunológica, sabemos que a autoreatividade para várias proteínas de mielina, incluindo a proteína básica de mielina, proteína proteolipídica,

glicoproteína associada à mielina e glicoproteína de oligodendrócito da mielina (MOG) tem sido observada em pacientes com EM^{52,62-68}.

Observa-se entretanto, que as células T de pacientes com EM apresentam uma atividade predominante contra a MOG em relação a outras proteínas da mielina, e anticorpos anti-MOG foram identificados ligados à desintegração da mielina em torno de axônios em lesões de EM aguda⁶⁻¹². Além disso, a sensibilização com a MOG reproduz a clínica e a patologia degenerativa desmielinizante da EM nos modelos de roedores e primatas⁶⁹⁻⁷⁴.

No tocante da fisiopatologia da doença sabe-se que a EM resulta em duas vias patológicas principais, são elas: inflamação e neurodegeneração. Até agora, a maioria dos mecanismos inflamatórios fisiopatológicos foi descoberta, mas a ligação com a neurodegeneração não é tão clara⁷⁵.

Hipóteses foram formuladas com a suposição de que a neurodegeneração na EM é a consequência direta da inflamação. Mediadores inflamatórios, como citocinas e enzimas proteolíticas, bem como radicais de óxido nítrico, podem contribuir para o dano axonal; o ataque imune dirigido aos componentes axonais também pode levar à destruição axonal; na EAE, a inflamação é capaz de aumentar a transmissão do glutamato no corpo estriado e de promover a degeneração sináptica, juntamente com a perda da coluna dendrítica (ambos marcadores de neurodegeneração). Sabe-se também que áreas com perda axonal proeminente têm proximidade com áreas contendo infiltrados inflamatórios (por exemplo, células T, macrófagos), sugerindo uma associação próxima entre lesão axonal e inflamação⁷⁶⁻⁷⁸.

A visão de que a inflamação é a causa da degeneração axonal e neuronal no cérebro de EM tem sido contestada e alguns autores acreditam que ambos os mecanismos são concomitantes e independentes. Um dos principais argumentos veio do fato de que tratamentos antiinflamatórios ou imunomodulatórios, embora parcialmente eficazes na fase recidivante da doença, têm efeito modesto ou nulo sobre o desenvolvimento de neurodegeneração e incapacidade clínica na fase progressiva da doença, particularmente em pacientes com doença progressiva primária. Além disso, a ressonância magnética não mostra correlação entre inflamação, representada por lesões de realce de gadolínio (Gd), e atrofia progressiva do cérebro e da medula espinhal⁷⁹⁻⁸¹.

Vamos a seguir descrever um pouco os fatores genéticos, ambientais, a microbiota e os fatores ambientais que são determinantes para o desenvolvimento da doença.

1.2.1 Fatores Genéticos

Enquanto acreditamos que a EM tenha uma origem multifatorial que inclui uma combinação de fatores genéticos e ambientais, os fatores genéticos parecem ter uma influência determinante⁸². Embora seja difícil quantificar o exato fator de risco para a EM, estima-se que acima de 60—70% do risco total de desenvolver EM seja proveniente de fatores genéticos^{83,84}.

Estudos relacionados à carga genética têm reconhecido genes que podem conferir susceptibilidade ao desenvolvimento da doença^{85,86}. Entretanto, estudos conduzidos com gêmeos verificaram uma baixa concordância nas taxas de EM - 30-40% para monozigóticos e 3-5% para dizigóticos - demonstrando que os fatores genéticos sozinhos podem não ser os principais responsáveis por essa condição⁸⁷.

Algumas vias e genes já estudados serão descritos a seguir para embasamento dos fatores genéticos. A via JAK/STAT é um essencial sinal usado por várias citocinas para iniciar a imunidade inata, coordenar a adaptativa e eventualmente está envolvida em respostas inflamatórias⁸⁸. Os processos de diferenciação de linfócitos T Th1, 2 e 17, todos usam essa via. Assim como processos de regulação do impacto de certas citocinas (INF- γ) nos macrófagos. Consequentemente, uma desregulação nessa via JAK/STAT está correlacionada com várias doenças imunologicamente mediadas, como a EM^{88,89}.

A superexpressão de genes de STAT foi detectada em EM e em EAE. O STAT3 foi também introduzido como um gene de susceptibilidade da EM⁹⁰. Monócitos e células T isoladas de pacientes em surtos continham grandes quantidades de STAT3 ativada em comparação com pacientes em remissão⁹¹. Liu *et al.*⁹², em 2014, propuseram um tratamento promissor com um inibidor da JAK1/JAK2 (AZD1480), que bloqueou o infiltrado de células imunes no SNC, prevenindo a ativação de STAT, reduzindo a desmielinização e a resposta patogênica de Th1 e Th17.

Outro fator de transcrição correlacionado com a EM é o NF- κ B, que regula respostas inflamatórias e está expresso em altos níveis nos neurônios, mostrando sua função crítica no SNC. Interessantemente, o NF- κ B possui funções opostas na neurodegeneração e neuroproteção, dependendo da subunidade que está ativa⁹³. Em indivíduos saudáveis, existe um balanço entre essas subunidades enquanto que nas doenças neurodegenerativas aumentam as subunidades responsáveis pela mediação da expressão de genes pró-apoptóticos, pró-inflamatórios e neurotóxicos⁹⁴.

Alterações genéticas como polimorfismo de um único nucleotídeo em vários componentes do sinal NF- κ B, mutação na posição 738 e uma inserção no seu gene promotor

foram todas associadas com a presença da doença e também com a fase progressiva, demonstrando portanto, uma real correlação desse fator de transcrição com a EM⁹⁵.

As proteínas transmembranas Notch, estruturas conservadas evolutivamente, regulam as interações entre células adjacentes, e tiveram suas funções descritas nas lesões de EM. Primeiramente verificou-se que a via Notch inibe a diferenciação de oligodendrócitos sugerindo uma possível prevenção do reparo da mielina na EM. Verificou-se também que os componentes Notch são expressos em lesões crônicas ativas de EM, atrelados à falhas na remielinização^{96,97}. Por outro lado, a sinalização Notch pode também estimular a diferenciação dos células precursoras de oligodendrócitos, executando uma função contraditória à primeiramente listada. Em lesões crônicas, o Jagged1, um ligante de Notch, é altamente expresso em astrócitos em comparação com as lesões silenciosas^{97,98}. Em consonância com esse dado, uma meta-análise com 13.896 indivíduos na Europa introduziu o Jagged1 como um gene de susceptibilidade à EM⁹⁹.

Outros fatores como as MAPKs e a PI3K que estão associados às numerosas cascatas de sinalização, intermediação de uma grande variedade de respostas celulares e mediadores de respostas imunes foram associados com a patogênese da EM. De acordo com algumas evidências, vários mecanismos mediados pela p38 MAPK têm potencial função na EM. Assim como a sinalização de PI3K pode desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias que aumentam a diferenciação de Th1/Th17, sugerindo seu envolvimento na EM^{100,101}.

Outra questão a ser abordada no tema da importância da genética no desenvolvimento da EM é a presença de transcritos de retrovírus endógenos que podem influenciar essa maquinaria. Por questões didáticas, abordaremos nos itens subsequentes esse tema.

Apesar de todas as evidências de fatores genéticos relacionados à EM, as modificações nas sequências gênicas parecem ser apenas um fator coadjuvante no desenvolvimento da doença. Há um crescente entusiasmo de que as condições epigenéticas possam justificar a parte que está faltando da hereditariedade.

1.2.2 Fatores Epigenéticos

Mecanismos epigenéticos regulam a expressão gênica sem alterar as sequências de DNA e podem também modular a resposta de vários fatores ambientais, possivelmente modificando a susceptibilidade à EM^{102,103}. Três mecanismos epigenéticos primários desempenham função na fisiopatologia da doença: metilação do DNA, modificação de histonas e regulação gênica pós-transcricional associada aos miRNA.

A metilação do DNA é conhecida por ter função crucial no desenvolvimento e proliferação normal das células e manutenção da estabilidade do genoma¹⁰⁴. Estudos demonstraram que a hipometilação em regiões promotoras de ilhas CpGs podem afetar o desenvolvimento da EM. Por exemplo, a hipometilação do promotor da peptidilarginina deiminase 2 resulta em aumento da expressão da própria enzima, que é responsável pela citrulinização da proteína básica da mielina, que contribui para a formação de uma mielina menos compacta e mais suscetível a desintegração, que é um fator chave na fisiopatologia da EM^{105,106}. Uma avaliação de 56 genes diferentemente metilados em pacientes com EM em comparação com controles saudáveis e casos de câncer, reconheceu a metilação do DNA como um biomarcador de atividade da doença¹⁰⁷.

A modificação das histonas induz mudanças na estrutura da cromatina e, portanto, influencia a acessibilidade dos fatores transcricionais, resultando em ativação ou repressão da expressão gênica¹⁰⁸. Uma variedade de modificações de histonas tem sido observada no desenvolvimento e na manifestação da EM. Em um estudo de pacientes com a forma progressiva e controles saudáveis, observou-se elevados níveis de acetilação de histonas H3 em oligodendrócitos de pacientes com estágios avançados da doença, sendo então a acetilação associada com a gravidade da EM¹⁰⁹.

A regulação gênica pós-transcricional associada aos Micro-RNA (miRNA) é responsável pela regulação da tradução em proteínas, que está envolvida em diversos processos celulares, como diferenciação, proliferação e apoptose^{110,111}. Os miRNAs são considerados biomarcadores ideais em doenças graves e existe um grande entusiasmo no estudo do papel de vários miRNAs no desenvolvimento da EM nos últimos anos. Um resultado compartilhado entre os estudos é que a desregulação dos miRNAs produz uma condição pró-inflamatória e a progressão da doença. Em pacientes com EM relatou-se desregulação de miR-155 células mononucleares sanguíneas e miR-326 em linfócitos T CD4+. Além disso, uma superexpressão de miR-326 foi vista em pacientes durante a fase do surto em detrimento aos controles saudáveis e fase de remissão¹¹²⁻¹¹⁵.

Quando se considera mudanças epigenéticas no cérebro de pacientes com EM é importante esclarecer que há a especificidade celular, na qual uma mesma alteração pode ser responsável por distintas funções nos diferentes tipos celulares.

Embora o melhor entendimento de cada um dos distintos efeitos dos mecanismos epigenéticos seja crescente, as literaturas atuais têm demonstrado que todos esses processos agem mais de forma integrada do que isoladamente.

1.2.3 Outros fatores ambientais: vitamina D e cigarro.

Além da interação entre mecanismos epigenéticos, há também a integração destes com fatores ambientais como deficiência de Vitamina D e fumo. A deficiência de vitamina D pode levar à modificações nas histonas, regulando a expressão gênica e o aumento do risco de EM e mais surtos¹¹⁶⁻¹¹⁸. A atividade de enzimas que contribuem para a demetilação nas histonas pode também ser controlada pela vitamina D¹¹⁹. Além disso, a vitamina D pode mediar a resposta imune através de mudanças epigenéticas – a vitamina D pode suprimir a expressão de IL-17A que reduz a acetilação de histonas do promotor de IL-17A¹²⁰. Altas doses de vitamina D podem também reduzir a proliferação de células T¹¹⁷⁻¹²¹.

O fumo também foi associado com a expressão de miRNAs e com a acetilação de histonas em pacientes com EM¹²². O fumo materno foi associado com estímulo de crescimento e diferenciação de neurônios pela metilação do promotor do fator neurotrófico neural (BDNF) e também com alguns miRNAs reduzidos (miR-16, miR-21 e mi4-16a)¹²³.

1.2.4 Modulação imunológica pela microbiota intestinal na EM

O termo “microbiota intestinal” refere-se ao conjunto genômico de bactérias, vírus, fungos e arqueas que habitam o intestino humano. Acredita-se que o intestino humano seja estéril no período fetal e a partir do contato com o ambiente e/ou com a vagina da mãe ao nascer, inicia-se a colonização. A microbiota continua então a se expandir durante a infância, influenciada por muitos fatores como dieta, higiene, uso de antibiótico, entre outros^{124,125}.

A importância da microbiota intestinal foi demonstrada em estudos experimentais com animais livres de germes. Neles, a falta dessa microbiota inibiu o desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino, assim como defeitos no sistema imune periférico¹²⁶. Efeitos em células dendríticas, *natural killers* e linfócitos B também já foram descritos.

A descoberta de que a microbiota intestinal produz moléculas que podem influenciar no sistema nervoso entérico e no central – neurotransmissores, já foi demonstrada por diversos estudos. Bactérias comensais podem regular a produção serotonina, melanina, GABA, histaminas e acetilcolinas^{127,128} e a desregulação dessas produções podem afetar o SNC.

A complexa interação dos fatores no eixo “microbiota-cérebro-intestino” pode ser desregulada em várias desordens do SNC e um melhor entendimento desses fatores se torna necessário. Estudos em pacientes com EM e microbiota intestinal ainda estão em estágios iniciais. Mas, dado que, tem importante função correlacionada ao sistema imune, cada vez mais encontramos evidências de que essa flora desempenhe papel na susceptibilidade da EM¹²⁹.

Em um estudo exploratório, em que amostras de fezes de pacientes com EM foram analisadas em comparação com amostras de controles saudáveis, observou-se um decréscimo na abundância de *Faecalibacterim* nos pacientes. A espécie *Faecalibacterium prausnitzii* é uma importante produtora de butirato, que está correlacionado com o aumento de células Treg, podendo assim sugerir um mecanismo pelo qual as alterações na microbiota intestinal pode predispor o desenvolvimento da EM. Diferenças entre a quantidade de algumas espécies de bactérias em pacientes com EM tratados com glatirâmer e não tratados foi também descrita. Assim como mudanças na microbiota intestinal em pacientes suplementados com vitamina D quando comparados tanto com pacientes não tratados como com os tratados com glatirâmer¹³⁰.

O efeito da vitamina D na microbiota intestinal tem sido investigado em alguns modelos animais da doença inflamatória intestinal. Como as bactérias não possuem receptores para vitamina D, intui-se que todos os efeitos da suplementação com vitamina D são mediados por efeitos nos hospedeiros que levam aos efeitos secundários na microbiota intestinal¹³¹.

Esse achado, de que o perfil microbiano do intestino pode diferenciar entre pacientes tratados e não tratados tem implicações imediatas para o desenho de novos estudos de microbiota intestinal e EM, com o objetivo de evitar heterogeneidade e confundidores.

Outra evidência indireta, pode ser verificada na avaliação de itens da dieta, como leite, gordura e carnes que podem alterar a microbiota intestinal e mostra uma associação positiva com doenças autoimunes¹³².

1.3 Etiologia Viral

A ideia de que um agente infeccioso cumpre um papel etiológico ou co-fatorial na patogênese da EM, tanto no desencadeamento da doença como no agravamento dos surtos acompanha a história dessa enfermidade como uma das noções mais debatidas ao longo do tempo. A chamada etiologia viral foi primeiramente afirmada por Pierre Marie em 1884 quando afirmou sua hipótese: “Fiquei impressionado com a ocorrência coincidente da esclerose em placas com doenças infecciosas e com a estreita relação que, do ponto de vista teórico, une essas doenças. Portanto, fiz um esforço para renovar minha ideia de que a esclerose em placas geralmente começa como um processo infeccioso”¹³³.

Desde então a teoria viral para a etiologia da EM continua sem confirmação por ausência de evidências de um agente infeccioso específico que preencha os postulados de Koch, e traz à luz uma constante discussão que se torna difícil de confirmar ou refutar mesmo frente a técnicas laboratoriais cada dia mais sofisticadas.

Enquanto que pode parecer tola a pesquisa de um agente infeccioso para justificar uma doença autoimune, esse conceito se espalha na pesquisa de diversas doenças autoimunes tais como lúpus eritematoso sistêmico¹³⁴, diabetes melitus tipo 1¹³⁵, além de outras. Enquanto muitos pesquisadores se debruçam em suas bancadas a procura de um agente viral etiológico o entendimento mais lógico dessa interação entre autoimunidade e doença viral é a de que um ou mais vírus exercem um papel fisiopatogênico inicial no desenvolvimento da disfunção do sistema imunológico ao invés da ideia clássica de uma infecção gerando uma doença diretamente pela infecção.

Diversos agentes infecciosos, em especial os vírus, interagem com o sistema imunológico e são capazes de induzir uma resposta autoimune. Os vírus são capazes de induzir autoimunidade por diferentes mecanismos sendo os principais: mimetismo molecular, a indução da expressão de antígeno do MHC e a superexpressão de receptores de superfície em leucócitos, a exposição de componentes celulares ocultos, atividade superantigênica e desregulação da apoptose, apenas para citar alguns^{136,137}.

Os caminhos pelos quais os vírus podem influenciar o desenvolvimento da doença postulam de um modo que um vírus pode infectar um adulto, aumentando posteriormente a sua chance de desenvolver EM, o que não aconteceria se a infecção tivesse ocorrido durante a infância. Outra teoria seria de que os patógenos desencadeantes teriam maior prevalência em áreas com maior prevalência de EM. Como já vimos a distribuição muito variável da EM ao longo do globo sempre gerou curiosidade. O ponto comum entre as duas teorias é que a idade durante a primeira infecção determina a susceptibilidade da população^{24,25}.

Temos também evidências da ocorrência de “epidemias” de EM, em situações nas quais houve um aumento repentino do diagnóstico da doença em comunidades isoladas. As principais descrições de epidemias de EM foram realizadas por Kurtzke a partir de dados na Islândia e nas Ilhas Faroé e em ambos casos ocorreram junto com a ocupação de tropas britânicas durante a 2ª Guerra Mundial^{138,139}. Muito se discutiu sobre esses artigos e sobre possíveis vieses e aumento do diagnóstico da doença se sobrepondo a esse período. Por outro lado, também não se encontrou casos similares de “transmissão” da EM em ocupações em outras regiões pelas mesmas tropas britânicas ou americanas. De qualquer modo, hoje esses dados considerados históricos, são chamados da “Saga Faroese” e dão algum apoio a teoria viral¹⁴⁰.

Outras evidências epidemiológicas de que a EM ocorre tardiamente a uma exposição a vírus, incluem a alta proporção de crianças com títulos positivos a diversos vírus em idade tenra em regiões onde a EM é rara; também a EM é uma doença de baixa incidência em

países onde o saneamento básico é pobre, em países pobres. Uma possível interpretação a esses estudos é de que existe uma relação inversa entre o risco de EM e a infecção precoce por agentes virais comuns: A infecção em crianças pequenas pode proteger contra EM, enquanto que mais tarde quando o sistema imunológico já está maduro, as infecções aumentam o risco^{141,142}. Esses estudos não focam em um agente em específico, mas sugerem um período na idade do indivíduo de suscetibilidade ligado a exposição a infecções e o risco posterior de desenvolver EM, sem se desconsiderar a importância da genética do indivíduo, já discutida.

Entre tantos vírus discutidos pela literatura científica, o Epstein Barr vírus (EBV) e o retrovírus endógeno humano da família W (HERV-W) parecem ser dois candidatos importantes e necessitam ser melhor estudados.

1.4 Vírus Epstein Barr

1.4.1 Conceitos gerais sobre o EBV

O EBV é o herpes vírus 4, um membro da família Herpesviridae. Existem dois sorotipos do vírus o EBV-1 e EBV-2. O EBV-1 é o mais comum e é de distribuição mundial; o EBV-2 é o mais encontrado na África equatorial e em indivíduos infectados pelo HIV. A partícula viral é composta pelo genoma viral, envolvido pelo nucleocapsídeo e envelope viral^{143,144}.

O EBV é o agente etiológico da mononucleose infecciosa (MI), caracterizada por febre, faringite, linfadenomegalia e linfocitose atípica. As infecções acusadas pelo EBV ocorrem em todo o mundo, sendo mais comum na infância e com um segundo pico durante o final da adolescência. Na idade adulta mais de 90% dos indivíduos já foram infectados e apresentam anticorpos contra o vírus. Em grupos socioeconômicos desfavorecidos e em áreas com padrões deficientes de higiene o EBV tende a infectar crianças pequenas, sendo rara a ocorrência de MI. Nas áreas com melhores padrões de higiene, a infecção por EBV com frequência só aparece na idade adulta e a MI é mais frequente. O EBV se propaga por contato com secreções orais, menor em assintomáticos, maior em imunocomprometidos e nos que têm MI¹⁴⁵.

Os anticorpos anti-EBV usualmente são medidos por imunofluorescência, mas podem ser avaliados pelo teste de ELISA, ambos com alta sensibilidade e especificidade. Os principais anticorpos pesquisados são:

a) IgG contra antígeno capsídeo viral (VCA) - atinge pico na fase aguda (segunda e terceira semana) da MI em títulos bastante altos. Como habitualmente os títulos detectados

inicialmente estão próximos aos títulos máximos atingidos pela IgG anti-VCA, um aumento de quatro vezes nos títulos é demonstrado em apenas 10% a 20% dos casos. Na convalescença, os títulos caem, mas mantêm-se detectáveis pelo resto da vida;

b) IgM anti-VCA - positiva-se precocemente na doença em cerca de 90% dos casos, havendo posterior declínio. Algumas vezes é transitória. Pode ser detectada no líquido cefalorraquidiano de doentes com quadro neurológico pelo EBV;

c) IgG contra antígenos precoces ou anti-EA - inclui IgG contra componente de difusão chamados de anti-D e IgG contra componente restrito chamados anti-R. O anti-D positiva-se em 70% a 80% dos casos. É anticorpo de fase aguda. O anti- R é importante no prognóstico da doença, estando relacionado a uma atividade contínua do EBV. Títulos de IgG anti-EA não devem estar mais presentes virtualmente após dois anos da fase aguda da infecção primária;

d) IgG anti-antígeno nuclear ou anti-EBNA - aumenta gradualmente, sendo detectada semanas ou meses após a infecção aguda, permanecendo elevada para o resto da vida. Em alguns doentes os anticorpos anti-EBNA já são detectados em três semanas. O tempo de aparecimento de IgG anti-EBNA na MI não tem relação com a gravidade da doença.

Além da pesquisa de anticorpos, pode ser feito a pesquisa de DNA do EBV por PCR no soro, que constitui melhor indicador de infecção ativa do que de vírus latente¹⁴⁶.

No início dos sintomas da mononucleose a maioria dos pacientes apresentam altos títulos de IgM anti-VCA, aumento de IgG anti-VCA e contra antígenos precoces. Embora anticorpos contra antígenos precoces frequentemente mantenham-se indetectáveis após a convalescência, o IgG anti-VCA permanece em níveis estáveis indefinidamente. Reação contra EBNA-1 e EBNA-2 aparece em diferentes tempos. O anti-EBNA 2 IgG aparece na fase aguda da doença e declina na convalescência enquanto o anti-EBNA 1 IgG torna-se detectável somente durante a convalescência e mantêm-se estável indefinidamente. Nos imunocomprometidos os níveis de anti-EBNA2 IgG aumentam enquanto de anti-EBNA1 diminuem, invertendo a relação anti-EBNA1 / anti-EBNA2, que em indivíduos imunocompetentes é maior que 1¹⁴⁷.

1.4.2 A associação entre o EBV e a EM

Aproximadamente 99% dos indivíduos com EM foram infectados pelo EBV comparados com 94% dos controles da mesma idade, assim, a EM é muito rara em pacientes que não foram infectados^{25,148}. Estudos recentes e meta-análises^{24,149,150} demonstraram um risco relativo aumentado (2x) para o desenvolvimento da EM aos previamente infectados por

MI^{145,151}. Existem algumas características biológicas do vírus que podem desencadear a autoimunidade da EM tais como o fato dele estabelecer uma infecção quiescente com produção viral contínua, com longos períodos de reativação e de modular o sistema imunológico.

Devido a alta prevalência do EBV na população adulta com ou sem EM, o estudo em crianças com EM são importantes para a definição dessa associação. Dado que a infecção por EBV é considerada quase uma condição para o paciente desenvolver EM, Pohl *et al.*¹⁵², estudou o comportamento da soroprevalência de EBV em crianças com EM, mostrando que enquanto 99% dos pacientes com EM tinham sorologia positiva para EBV, em controles saudáveis da mesma idade a prevalência era de 72% ($p=0,001$).

Um estudo de caso controle realizado no exército americano mostra que dos 10 casos (100%) EBV negativos pesquisados, todos tornaram-se EBV positivos antes do início da EM, enquanto apenas 35,7% dos controles saudáveis que nunca desenvolveram EM soroconverteram ($p=0,0008$) [153]. De Lorenze *et al.*¹⁵⁴ também correlacionam a sorologia do EBV com desenvolvimento da EM mostrando que já existia um aumento significativo dos anticorpos até 20 anos antes dos primeiros sintomas da EM.

A detecção direta do DNA do EBV, referida como carga viral, no líquido cérebro-espinhal ou no sangue periférico sugeriu inicialmente uma função para o vírus nos surtos da EM. Entretanto, a frequência de positividade do DNA EBV não se demonstrou diferente entre pacientes e controles. Avaliando o DNA do EBV em ambas as fases (latente e ativa) da doença nas células polimorfonucleares sanguíneas também não encontraram diferença, nem quando comparado pacientes com EM e com outras doenças neurológicas¹⁵⁵⁻¹⁵⁸. Esses resultados sugerem que não há ligação direta entre EBV e risco de reativação da doença. Dois estudos longitudinais, 5 e 7 anos de seguimento, mostraram uma positiva associação entre os títulos de anticorpos anti-EBNA1 IgG e elevada pontuação na Escala expandida de estado de incapacidade de Kurtzke (EDSS), $r=0,3$ e $r=0,21$ respectivamente^{159,160}.

Associações entre resposta imune anti-EBV e alterações detectadas na RM, incluindo lesões e atrofia, foram métodos também utilizados para avaliar a relação do vírus com o curso clínico da doença. Estudos correlacionaram o volume e o número de lesões medidas pela RM com título de anticorpos anti-EBNA1 IgG^{159,161}. Outro estudo também correlacionou atrofia cerebral e aumentado volume de lesões identificadas na RM com os títulos de anti-VCA IgG¹⁶².

No geral, a associação entre os biomarcadores de EBV e atividade da EM é menos consistente que a vista com o desenvolvimento da doença.

Se existe uma relação entre a infecção de EBV e o curso clínico da EM, o impacto na patologia pode não ser suficientemente substancial para alterar os sintomas clínicos nos intervalos observados – maioria dos estudos realizados num intervalo de menos de 5 anos. Períodos de observações maiores são necessários para melhor entender se há essa relação.

O mimetismo molecular se apresenta como a hipótese mais plausível, em que as similaridades antigênicas entre os peptídeos virais e os epítomos do hospedeiro, podem levar a um ataque autoimune nas células hospedeiras e em seus componentes. Em concordância com essa hipótese, dois estudos^{163,164} demonstraram reação cruzada entre os antígenos EBV e a proteína mielina pelos linfócitos T citotóxicos. Essa propriedade de reatividade dos linfócitos T também indicam que a patogênese da EM pode incluir uma resposta autoimune, mediada por células T, no SNC. Entretanto, agregações de linfócitos B nas meninges de pacientes com EM têm desafiado a ideia de que essa seja uma doença apenas mediada por linfócitos T¹⁶⁵.

Baseado nesses dados, sugere-se que uma disfunção na reatividade dos linfócitos T citotóxicos aos linfócitos B infectados por EBV, permita a expansão desses linfócitos B infectados. Dando apoio à essa ideia¹⁶⁶, encontrou-se uma diminuição na frequência de células T CD8+ reativas à EBV nos pacientes com EM quando comparados à controles saudáveis.

Esses resultados fundamentam a hipótese que a deficiência de células T determinada geneticamente possa ser responsável pela inabilidade de controlar/suprimir os linfócitos B infectados. Esses podem se mover para o SNC e produzir auto-anticorpos patogênicos, assim como sinais co-estimuladores de sobrevivência que podem inibir a apoptose das células T autoreativas.

Entretanto, a associação entre a resposta imune ao EBV na progressão da EM não foi confirmada até o momento. As discrepâncias encontradas nas investigações realizadas até então, são provavelmente devido à diversidade na qualidade das amostras e das técnicas de detecção, ainda assim a maioria dos pesquisadores acredita nessa associação.

1.5 Os retrovírus endógenos humanos da família W e a EM

Os retrovírus endógenos humanos (*Human Endogenous Retroviruses* - HERV) surgiram de infecções antigas de células hospedeiras da linhagem germinativa por retrovírus exógenos e hoje, constituem cerca de 8% do genoma humano¹⁶⁷.

Efeitos neurotóxicos de proteínas produzidas a partir da transcrição das sequências gênicas de HERV no SNC, levam a hipótese que elas tenham uma função no desenvolvimento da EM.

Dos vários HERVs, o retrovírus associado à EM, do inglês, *multiple sclerosis associated retrovirus* (MSRV), foi o primeiro a ser descoberto em leptomeninges de pacientes com EM. Trata-se de um vírus envelopado, com a atividade de transcriptase reversa, que representa o protótipo da família HERV-W do grupo 2 no genoma humano¹⁶⁸⁻¹⁷⁰.

Os estudos têm sido sugeridos que as partículas de MSRV se originaram de provírus HERV-W modificados, ou a partir de um membro exógeno transmissível da mesma família^{169,171,172}. Víriões de MSRV são dotados de propriedades como a expressão de superantígenos e indução da produção de citocinas por células mononucleares no sangue periférico humano¹⁷³. Nesse estudo utilizaremos HERV-W e MSRV como termos semelhantes, apesar de haver uma pequena diferença.

Vários estudos caso-controles demonstraram alta positividade de RNA de MSRV no soro de pacientes com EM, quando comparados com controles saudáveis^{174,175}. Um estudo multicêntrico com 149 pacientes e 153 controles encontrou uma positividade de MSRV em 71,4% dos pacientes, contra apenas 17,3% dos controles saudáveis¹⁷⁶. Além disso os níveis de RNA de MSRV foram maiores em pacientes com as formas secundariamente progressivas que nos remitentes recorrentes. Esse mesmo estudo também correlacionou a presença da doença com maior número de cópias de MSRV¹⁷⁷.

Já as tentativas de associação entre HERVs e curso da doença foram poucas e inconsistentes. Um dos estudos encontrou correlação entre HERV-W e uma pontuação de gravidade de EM, mas ela foi vista apenas em mulheres e com um índice de correlação considerado fraco ($r=0,34$)¹⁷⁸.

Um estudo prospectivo de 6 anos de seguimento com 18 pacientes, demonstrou que apesar de similar incapacidade e taxa de surtos no início do estudo, aqueles com MSRV no LCR no *baseline* tinham maiores EDSS e taxas de surtos anualizadas no final do estudo¹⁷⁹.

Partículas de HERV associadas com a atividade de transcriptase reversa foram confirmadas como uma marca da expressão do MSRV^{180,181} e um protocolo seletivo para detecção do RNA de virion-associado ao MSRV através de PCR foi desenhado para detectar a sua presença em material biológico¹⁷⁴. Usando esse método, entretanto, o estudo de Schmitt *et al.*¹⁸² não encontrou diferenças entre os níveis de transcrição na substância branca, quando comparados pacientes e controles saudáveis.

Adicionalmente ao direto impacto da presença dos produtos do HERV, alguns estudos investigaram se a proteína do envelope (MSRV-env) poderia diretamente modular a secreção de citocinas. Um estudo evidenciou uma aumentada secreção de IL-6 e TNF-alfa por células polimorfonucleares estimuladas por MSRV-env cultivadas *in vitro*¹⁷³. Experimentos em

animais demonstraram que a MSR_V-env pode induzir a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α ¹⁸³. Esses resultados sugerem que as MSR_V-env trabalham como superantígenos, afetando as células T e causando superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, podendo causar uma resposta imune aberrante com uma ativação anormal de linfócitos T policlonal.

A transativação de promotores de HERV-W por vírus exógenos também demonstrou induzir uma desregulação epigenética superativando assim o HERV-W¹⁸⁴.

Uma meta-análise incluiu 25 artigos que avaliaram MSR_V/HERV-W em pacientes com EM. Foi observado que houve aumento da expressão de MSR_V/HERV-W em 20 deles, tanto no sangue, no LCR e como no tecido cerebral¹⁸⁵. Essas análises foram subdivididas para cada uma das proteínas estudadas (*Env* e *Pol*) e os resultados para a *Env* demonstraram alta razão de probabilidade (OR=22.66), sem inconsistências ou vieses. Já para a proteína *Pol*, apesar de alta OR, verificaram também alta heterogeneidade entre os estudos (61,2%) e evidências de importantes fatores confundidores, como sexo, idade, curso da doença e controles selecionados.

O maior fator limitante para essas meta-análises são as pequenas populações estudadas, que podem não ser representativas, tanto para pacientes como para controles, mas apesar desse fato, esses resultados sustentam fortemente a evidência de associação entre HERVs, em particular MSR_V/HERV-W e EM.

1.6 EM e o uso de medicamentos com efeitos antivirais

Outra questão importante para abordarmos são os chamados estudos translacionais, nos quais evidências de bancada geram premissas para o estudo clínico de intervenção no tratamento das doenças em questão. Até o momento, poucos estudos foram conduzidos a partir da perspectiva da infecção viral para o tratamento de EM, apesar do possível potencial dessa intervenção. Drogas antivirais como aciclovir e valaciclovir são medicações baseadas em nucleosídeos, que inibem a função da DNA polimerase viral e bloqueiam a replicação lítica após serem englobadas pelos linfócitos B infectados. Estudos clínicos testaram, mas não encontraram diferenças nas taxas de surtos, nem nos números de novas lesões detectadas pela RM^{186,187}. Se, de fato, outro mecanismo está envolvido, incluindo o potencial de transativação dos HERVs ou o mimetismo molecular induzindo a resposta imune, então as drogas antivirais realmente não terão impactos na EM.

O Natalizumabe é uma terapia que utiliza um anticorpo monoclonal anti alfa-4-integrina para prevenir a migração de leucócitos para o SNC¹⁸⁸, podendo interferir na síntese

de imunoglobulina¹⁸⁹, e foi testado para sua influência no nível de anticorpos contra o herpesvirus humano. Recentemente, um estudo longitudinal, com seguimento de 2 anos, mostrou uma diminuição nos níveis de anti-HHV6-IgM/IgG em pacientes tratados com Natalizumabe e uma correlação entre a variação de anticorpos e resposta clínica ao tratamento¹⁹⁰. Entretanto outro estudo prospectivo, com seguimento de 21 meses, encontrou níveis estáveis de anti-EBNA-1 no período do tratamento¹⁹¹.

O anticorpo monoclonal humanizado contra o *env* do HERV-W (GNbAC1) está sendo testado em um estudo clínico de fase 2 e demonstrou uma significativa redução dos transcritos de HERV no grupo tratado¹⁹². Os dados laboratoriais demonstram também que o uso desse anticorpo pode prevenir a transcrição gênica mediada pelo MSRV-*env* e restabelecimento da diferenciação de precursores dos oligodendrócitos¹⁹³.

1.7 Associação entre EBV, HERV-W e EM

Diversos artigos têm estudado a associação entre o EBV, o HERV-W e a EM baseada nas observações apresentadas.

Nosso grupo investigou o nível de similaridade entre a proteína do envelope de HERV-W e a MOG. A comparação da MOG ao envelope de retrovírus identificou cinco regiões retrovirais semelhantes ao domínio *Ig-like* da MOG estendendo a ideia de que o HERV-W pode estar envolvido na imunopatogênese da EM, ao talvez, facilitar o reconhecimento da MOG pelo sistema imunológico. Também mostramos que a maioria dos pacientes apresentou expressão do envelope de HERV-W em algum nível. Nove das dez amostras testadas apresentaram níveis médios e altos de expressão envelope HERV-W, contra níveis muito baixos de expressão (cinco indivíduos apresentaram atividade basal HERV -W) ou nenhuma atividade (cinco indivíduos) em controles saudáveis, confirmando a associação entre atividade EM e HERV -W em nossa população¹⁹⁴.

Sabemos também que os linfócitos B infectados por EBV são capazes de transativar o gene do *Env* do HERV-K18, processo em que a proteína de membrana latente possui papel fundamental, dando início à uma cascata de sinalização e indução do HERV^{195,196}.

Mameli *et al.*¹⁹⁷ mostrou que o EBV estimula a expressão de HERV-W em células provenientes de sangue e cérebro, *in vitro*. Nesse artigo é apresentado um possível modelo para explicar a patogênese da doença na qual o EBV atuaria como gatilho inicial da EM ao estimular a expressão do HERV-W, e que, anos mais tarde, o HERV-W seria o contribuinte real para patogenicidade da EM através de seu mimetismo molecular, justificando inclusive o comportamento da doença em sua forma remitente recorrente.

1.8 Justificativa

Vários vírus já foram correlacionados com a patogênese da EM em especial o EBV e o HERV-W. Entretanto até o presente momento existem muitas dúvidas sobre o papel desses vírus na etiologia e no desenvolvimento da doença.

O HERV-W em específico, apesar de mostrar elevada prevalência em pacientes com EM, bem como estar presente nas lesões desmielinizantes, nunca foi correlacionado longitudinalmente com a atividade da doença e esse estudo pode modificar o modo como entendemos a interação entre esses elementos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Investigar a correlação entre a atividade clínica e imagiológica por RM da EM com a avaliação quantitativa do HERV-W e do EBV no sangue de pacientes com EM.

2.2 Objetivos Secundários

Avaliar a presença de anticorpos IgM e IgG do Herpesvirus EBV e do HERV-W e comparar os dados dos pacientes com EM com controles saudáveis e com outras doenças neurológicas.

3 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

Conduzimos estudo prospectivo observacional, longitudinal durante quatro anos, entre janeiro de 2013 e dezembro de 2017. Os dados clínicos foram obtidos através das consultas médicas realizadas semestralmente nos pacientes com diagnóstico confirmado de EM do ambulatório do Centro de Atendimento e Tratamento de Esclerose Múltipla da Santa Casa de São Paulo (CATEM)¹⁴.

Todos os pacientes da presente pesquisa são estudados segundo os preceitos da Declaração de Helsinque e do Código de Nuremberg, respeitadas as normas de pesquisas envolvendo seres humanos (Res. CNS 466/12) do Conselho Nacional de Saúde, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de São Paulo–(ISCMSP) e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo parecer Consubstanciado 1.740.773 – (anexo A), proposto pela Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, registrado na Plataforma Brasil e registrado no ClinicalTrials.gov como NCT0248987.

Após esclarecimento sobre a pesquisa, os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)– (anexo B) - para participação da mesma.

Os pacientes foram atendidos no CATEM onde foram coletados os dados demográficos, histórico familiar, avaliado o tipo de doença, investigado o tempo de doença, primeiros sintomas, uso de medicações e realizado o exame neurológico completo, por neurologista. Em cada avaliação semestral era avaliado o EDSS e investigado ativamente sobre sintomas de surto da doença. Anualmente foram realizadas RM de crânio; e RM de coluna apenas se houvesse o aparecimento de novos sinais ou sintomas sugestivos de lesão medular. Os pacientes foram orientados a procurarem o serviço no caso de suspeita de surtos ou aparecimento de novos sinais ou sintomas ou informarem a equipe do serviço caso fossem atendidos em outro local.

3.1 Seleção da amostra

Os sujeitos do estudo foram selecionados de forma aleatória dentre os pacientes portadores de todas as formas de EM que fazem acompanhamento no CATEM. Os critérios de inclusão foram: idade entre 18 e 60 anos, com diagnóstico de EM conforme os critérios revisados de McDonalds de 2010⁵⁰, sem restrição de EDSS, sem restrição de forma progressiva ou inflamatória de EM. Foram excluídos pacientes com doenças inflamatórias do SNC, infecciosas ativas ou sorológicas positivas para HIV, hepatite B ou C ou HTLV 1/2 ou

neoplásicas concomitantes, bem como doenças psiquiátricas que não fossem depressão ou ansiedade. Foram excluídas pacientes gestantes ou lactantes nesse período.

Os controles saudáveis foram selecionados randomicamente através dos alunos e funcionários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMT-SP) e do CATEM. Jovens adultos (> 18 anos), sem doenças infecciosas ou doenças neurológicas e que não tivessem histórico de EM na família foram convidados a participar do projeto e incluídos.

Para controles com outras doenças neurológicas (ODN), foram incluídos randomicamente pacientes acompanhados nos ambulatórios de neurologia da Santa Casa de São Paulo. Foram elas: Doença de Parkinson (n=6); Epilepsia (n=6); Acidente Vascular Cerebral (AVC)(n=5); Polineuropatia Periférica (n=2); Enxaqueca sem aura (n=2); Doença de Pompe (n=1); Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (PDIC)(n=1); Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)(n=1), Miastenia Grave (n=1), Cefaléia de curta duração, unilateral, neuralgiforme com hiperemia conjuntival e lacrimejamento (SUNCT)(n=1); Síndrome Cefálea em salvas – neuralgia do trigêmeo (Cluster-TIC)(n=1); Trombose Venosa Cerebral+Neuralgia Occipital (n=1). As amostras controle foram pareadas com os casos estudados por sexo e idade.

O tamanho amostral foi decidido com base na porcentagem da população com e sem EM que apresentam expressão de HERV-W detectável em células mononucleadas do sangue periférico (PBMC). O tamanho amostral dos três grupos foi estimado a partir do software aberto Epi-Info (<https://wwwn.cdc.gov/epiinfo/html/downloads.htm>).

Embora o número de pacientes com EM que exibe atividade de envelope de retrovírus seja próximo à 95%^{173,198}, assumimos valores mais conservadores para o cálculo amostral: 50% para EM e 10% para controles, totalizando 28 casos e 28 controles, baseado em nível de confiança = 95% e poder de detecção de 80%, de acordo com método de Kelsey¹⁹⁹.

Baseado nesses valores propostos, incluímos:

- a) 39 pacientes com EM - 3 excluídos por opção dos pacientes;
- b) 30 indivíduos inseridos no grupo “controles saudáveis”;
- c) 28 pacientes no grupo ODN.

N total foi de 97 indivíduos.

3.2 Coleta e envio do material

A coleta de sangue dos pacientes provenientes dos ambulatórios de neurologia (CATEM e demais especialidades) foi feita durante sua consulta de rotina previamente agendada em outra ocasião, por profissional qualificado. Dois tubos de sangue

foram coletados, um seco, para a realização de ensaios sorológicos e outro com EDTA para a realização de análises moleculares. O sangue dos pacientes do grupo controle foi coletado no laboratório de Virologia -LIM 52 do IMT-SP.

Todos os materiais colhidos nos ambulatórios da Santa Casa foram enviados para o laboratório de virologia do IMT-SP, onde os experimentos laboratoriais foram realizados.

3.3 Análise laboratorial

As amostras de sangue que foram destinadas as análises sorológicas, colhidas em tubo seco, tiveram o soro separado através de centrifugação, em no máximo 2 horas após a coleta. Já as amostras de sangue destinadas às análises moleculares foram centrifugadas a 1.500g por 10 minutos para separação do plasma, dos leucócitos e das hemácias. O *buffycoat* foi coletado e tratado com Buffer EL (*Erythrocyte Lysis Buffer – Qiagen*) para completa remoção de eritrócitos. Esse tampão lisa os eritrócitos rapidamente por choque hipotônico e térmico, e os leucócitos intactos são recuperados após a centrifugação. As amostras foram estocadas em freezer -80C° até o momento da etapa de extração de RNA.

3.3.1 Sorologia para o vírus EBV

A determinação de infecção prévia e/ou ativa pelo vírus Epstein Barr foi feita através de imunoensaio ELISA, para detecção de anticorpos anti VCA de IgG e IgM anti-EBV - kits comerciais (Serion, Brasil). A reação de ELISA é um imunoensaio baseado na interação específica de anticorpos à seus respectivos antígenos. Microplacas de poliestireno cobertas com antígenos puros são usadas para captar anticorpos específicos no soro diluído, caso existam. Em uma segunda etapa, os anticorpos ligados são detectados utilizando anticorpos marcados com peroxidase. Em uma terceira etapa, os anticorpos tornam-se visíveis usando-se o cromógeno, que é capaz de proporcionar uma reação de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro.

3.3.2 Análises Moleculares

A extração de RNA foi realizada pelo método de Trizol-clorofórmio, onde ocorre a quebra das membranas celulares com 1ml de Trizol e posterior adição de clorofórmio na proporção 1:5. As amostras foram então homogeneizadas em aparelho tipo vórtex e centrifugadas em velocidade máxima por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante contém o RNA. O RNA foi precipitado com Isopropanol 100% e lavado com Etanol 75%. Em seguida, os tubos contendo o RNA precipitado foram secos em temperatura

ambiente para a completa remoção do Etanol, e o RNA foi eluído em 40µl de H₂O *Nuclease-Free*. As amostras foram quantificadas em aparelho Nanodrop (Thermo) e para certificação da integridade do RNA, submetemos as amostras à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Com o corante Gel Red (Uniscience), que cora material nucleico de fita simples, torna-se possível a visualização de todo e qualquer ácido nucleico de fita simples incluindo RNA mensageiro e RNA ribossomal.

Somente as amostras que continham RNA foram submetidas à transcrição reversa e à reações de ampliações – PCR em tempo real. O teste utiliza *Sybr Green* e *primers* complementares ao gene env. do HERV-W. Como controle endógeno, o gene GAPDH foi utilizado. Os *primers* foram utilizados na concentração inicial de 10nM e estão descritos na Tabela 2.

As condições de ciclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto. Após o término dos ciclos uma etapa de dissociação foi adicionada para correta discriminação dos produtos gerados através do pico de *melting*.

O teste de PCR em Tempo real foi padronizado neste laboratório e apresentou limite de detecção de 117 cópias/ml.

Tabela 2- *Primers* utilizados.

PRIMER	SEQUÊNCIA
ENV-F1	CCAATGCATCAGGTGGGTAAC
ENV-R1	GAGGTACCACAGACAAAAATATTCCT
GAPDH-F2	ACCCACTCCTCCACCTTTGAC
GAPDH-R2	TGTTGCTGTAGCCAAATTCGT

1 Env- Nellaker 2006; GHPDH- Sikand 2012

A quantificação relativa foi calculada com base nos cts obtidos dos dois genes, e para o cálculo do $-2\Delta\Delta Ct$ a partir de $2^{-\Delta\Delta Ct}$: (ct gene alvo (MS) - ct gene endógeno (MS)) (ct gene alvo (Controle) - ct gene endógeno (Controle)). O valor de delta-ct foi calculado com a média de todos os indivíduos controles utilizados.

3.4 Análise de atividade clínica e imagiológica da doença

Os pacientes foram avaliados quanto ao grau de atividade clínica e imagiológica da doença através da análise de taxa de surtos anualizada, aumento da escala de EDSS e aumento de lesões na RM crânio quando comparadas aos exames realizados nos últimos dois anos,

quanto a presença de novas lesões hiperintensas em T2/FLAIR e novas lesões captantes de Gd.

As RM crânio foram realizadas apenas para o grupo com EM no serviço de Radiologia da Santa Casa, no momento em que o paciente foi incluído e a cada 6 ou 12 meses a depender da evolução clínica e após um ano do primeiro exame. Para aqueles pacientes que tinham exames prévio também realizados no mesmo serviço, os dados foram utilizados.

Os pacientes realizam os exames conforme indicação clínica convencional seguindo o procedimento de agendamento habitual, solicitadas anualmente ou na suspeita de novos sinais ou sintomas da doença, situação em que também pode ser incluída a solicitação de RM de coluna. O radiologista responsável pela avaliação das imagens não tem informações clínicas ou laboratoriais dos pacientes, com exceção do aparecimento de novos sinais ou sintomas, situação na qual o radiologista é informado sobre esses sinais ou sintomas suspeitos.

3.5 Análise estatística

3.5.1 Parâmetros analisados

Para elaboração deste estudo foram analisados 3 grupos sendo:

- a) pacientes com EM;
- b) controles saudáveis e;
- c) controles ODN.

Em todos os grupos foram analisados dados demográficos, sorologia anti VCA IgM e IgG do EBV que denominamos IgM EBV e IgG EBV e expressão relativa do HERV-W que estamos denominando *fold change*, por ser sempre descrito em sua expressão relativa ao gene endógeno.

Nos pacientes com EM foram avaliados os parâmetros:

- a) EDSS;
- b) Taxa anualizada de surtos que denominamos Surto;
- c) O aumento de lesões em T2/FLAIR pela RM que denominamos RM T2;
- d) O aparecimento de lesões captando Gd na RM que denominamos RM Gd;
- e) O medicamento utilizado no período.

Determinamos o momento da primeira coleta de sangue como sendo T 0, e assim os parâmetros descritos acima foram avaliados:

- a) 24 meses antes da primeira coleta, que denominamos de T -24;
- b) 12 meses antes da primeira coleta, que denominamos de T -12;

- c) No momento da primeira coleta, que denominamos T 0;
- d) No momento da segunda coleta, que ocorreu 6 meses após a primeira coleta, que denominamos T 6;
- e) No momento da terceira coleta, que ocorreu 12 meses após a primeira coleta, que denominamos T 12.

A evolução dos pacientes segundo alguns critérios (EDSS, Surto, RM T2, RM Gd e Medicamento) foram avaliados em T-24, T-12, T0, T6 e T12, a expressão relativa de HERV-W em *fold change* foi determinada em T0, T6 e T12 e a detecção de IgG e IgM anti- EBV em T0.

Os gráficos individuais de evolução que mostram em cada sujeito do grupo EM o comportamento da taxa anualizada de surto, EDSS, novas lesões T2/FLAIR e Gd+ comparando com a expressão do *fold change* do HERV-W e IgG anti EBV encontram-se no anexo C, no fim desse estudo.

3.5.2 Testes estatísticos

Foram descritos os sexos das pessoas segundo grupos com uso de frequências absolutas e relativas e verificada a associação com uso de teste qui-quadrado²⁰⁰. As idades e as determinações da presença de IgG anti-EBV e de HERV-W no T0 foram descritos segundo grupos com uso de medidas (média, desvio padrão, mediana, mínimo e máximo) e comparadas entre os grupos com uso de análise de variâncias (ANOVA) seguidas de comparações múltiplas de Bonferroni²⁰¹ ou testes Kruskal-Wallis seguidos de comparações múltiplas de Dunn²⁰⁰. As quantificações de IgG EBV e do o HERV-W foram descritas segundo subgrupos das outras doenças neurológicas com uso de medidas resumo e comparados entre os grupos com uso de testes Kruskal-Wallis.

No grupo EM foram descritas as características qualitativas avaliadas com uso de frequências absolutas e relativas e as características quantitativas foram descritas com uso de medidas resumo. O HERV-W no basal foi descrito segundo cada característica de interesse e comparado entre as categorias com uso de testes Kruskal-Wallis ou testes Mann-Whitney. Foram calculadas as correlações de Spearman entre a dosagem de HERV-W basal e a idade e tempo de doença dos pacientes.

O HERV-W foi descrito segundo evolução dos pacientes, segundo cada critério ao longo do seguimento com uso de medidas resumo e comparado entre as categorias e momentos com uso de equações de estimação generalizadas com matriz de correlações auto-

regressiva de ordem 1 entre os momentos, com distribuição marginal Normal e função de ligação logarítmica²⁰².

Os resultados do seguimento foram ilustrados com uso de gráficos de perfis médios com os respectivos erros padrões segundo as categorias de alteração para cada critério. Para realização das análises foi utilizado o software *IBM-SPSS for Windows* versão 20.0 e para tabulação dos dados foi utilizado o software Microsoft Excel 2003. Os testes foram realizados com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Realizamos o estudo em 36 pacientes no grupo EM, 30 indivíduos saudáveis e 28 no grupo ODN.

Não encontramos a expressão de HERV-W em apenas 4 indivíduos do grupo controles saudáveis, entre os 94 sujeitos investigados dos 3 grupos, e esses indivíduos não foram utilizados para as análises estatísticas da expressão relativa do HERV-W.

Todas as avaliações de IgM anti VCA EBV foram negativas e as análises estatísticas não incluíram essa variável. Na análise do IgG anti VCA EBV, apenas 3 indivíduos do grupo controle saudáveis eram negativos, todos os outros positivos.

A Tabela 3 traz a descrição das características pessoais e informações clínicas dos pacientes do grupo EM.

Tabela 3- Descrição das características pessoais e informações clínicas dos pacientes EM.

Variável	Descrição
Sexo	
Feminino	21 (58,3)
Masculino	15 (41,7)
Idade (anos)	
média $\pm$ DP	41,8 $\pm$ 12,6
mediana (mín.; máx.)	40 (20; 61)
Raça	
Branca	22 (66,7)
Parda	7 (21,2)
Negra	4 (12,1)
Tempo de doença (meses)	
média $\pm$ DP	60,9 $\pm$ 65,7
mediana (mín.; máx.)	48 (1; 264)
EM na família	
Não	28 (84,8)
Sim	5 (15,2)
Tipo EM	
RR	21 (63,6)
PP	4 (12,1)
SP	8 (24,2)
T -24 EDSS	
média $\pm$ DP	2,9 $\pm$ 2,2
mediana (mín.; máx.)	2 (0; 6,5)
T -24 surto	
0	12 (41,4)
1	15 (51,7)
2	1 (3,4)
4	1 (3,4)
T -24 RM T2	
0	16 (69,6)
1	1 (4,3)
3	4 (17,4)
5	2 (8,7)
T -24 Medicamento	
N	2 (6,9)
F	2 (6,9)
TMO	1 (3,4)
G	2 (6,9)
C	5 (17,2)
B	9 (31)
ST	6 (20,7)
MTX	2 (6,9)
T -12 EDSS	
média $\pm$ DP	3,1 $\pm$ 2,3
mediana (mín.; máx.)	2 (0; 7)
T -12 surto	
0	18 (62,1)
1	10 (34,5)
2	1 (3,4)
T -12 RM T2	
0	12 (63,2)
1	3 (15,8)
2	2 (10,5)
3	2 (10,5)
T -12 RM Gd	
0	12 (63,2)
1	3 (15,8)
2	3 (15,8)
4	1 (5,3)
T - 12 Medicamento	
N	4 (13,8)
F	2 (6,9)
TMO	1 (3,4)
G	1 (3,4)
C	5 (17,2)
A	1 (3,4)
B	8 (27,6)
ST	5 (17,2)
MTX	2 (6,9)

Legenda: N- natalizumabe; F- Fingolimode; TMO- Transplante de medula óssea; G- Acetato de Glatiramer; A- Azatioprina; B- betainterferon; ST- Sem tratamento; MTX- mitoxantrone.

Os pacientes do grupo ODN foram randomizados entre os ambulatórios da neurologia da Santa Casa de São Paulo sendo excluídos os ambulatórios que atendiam doenças inflamatórias do SNC. Os diagnósticos dos pacientes do grupo ODN encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Diagnósticos das doenças dos pacientes no grupo outras doenças neurológicas

Diagnóstico	n (%)
Doença de Parkinson	6 (21,4)
Epilepsia	6 (21,4)
AVC	5 (17,8)
Polineuropatia Periférica	2 (7,1)
Enxaqueca sem aura	2 (7,1)
Doença de Pompe	1 (3,5)
PDIC	1 (3,5)
ELA	1 (3,5)
Miastenia Grave	1 (3,5)
SUNCT	1 (3,5)
CLUSTER-TIC	1 (3,5)
Trombose Venosa Cerebral	1 (3,5)

AVC: acidente vascular cerebral

PDIC: polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica

ELA: esclerose lateral amiotrófica

SUNCT: cefaléia de curta duração, unilateral, neuralgiforme com hiperemia conjuntival e lacrimejal

CLUSTER-TIC: síndrome cefaléia em salvas - neuralgia do trigêmeo

A Tabela 5 mostra a descrição das características avaliadas segundo grupos e resultado dos testes estatísticos e apresenta que a idade, as dosagens de IgG anti-EBV e a expressão HERV-W (*fold change*) basal (T0) apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Descrição das características avaliadas segundo grupos e resultado dos testes estatísticos.

Variável	Grupo			Total	p
	Controle	Outras doenças neurológicas	Esclerose múltipla		
Sexo, n (%)	(N = 30)	(N = 28)	(N = 36)	(N = 94)	0,680*
Feminino	20 (66,7)	19 (67,9)	21 (58,3)	60 (63,8)	
Masculino	10 (33,3)	9 (32,1)	15 (41,7)	34 (36,2)	
Idade (anos)	(N = 30)	(N = 27)	(N = 33)	(N = 90)	0,031**
média ± DP	41,1 ± 18,4	51,1 ± 15,6	41,8 ± 12,6	44,4 ± 16,1	
mediana (mín.; máx.)	33 (20; 84)	50 (16; 84)	40 (20; 61)	45 (16; 84)	
IgG EBV (UI/ml)	(N = 20)	(N = 28)	(N = 33)	(N = 81)	0,006
média ± DP	947,6 ± 440,5	1220,7 ± 412,9	1333,3 ± 276,4	1199,1 ± 397	
mediana (mín.; máx.)	992,8 (0; 1642,8)	1284,3 (0; 1736,5)	1273,8 (709,9; 1766)	1251,8 (0; 1766)	
T0 Fold Change	(N = 26)	(N = 28)	(N = 36)	(N = 90)	<0,001
média ± DP	3,3 ± 5	7,6 ± 4,1	6,4 ± 6,2	5,9 ± 5,5	
mediana (mín.; máx.)	1,4 (0; 21,1)	5,8 (2,4; 20,5)	4,9 (0,2; 31,9)	4,8 (0; 31,9)	

Teste Kruskal-Wallis; ** ANOVA; * Teste qui-quadrado

Pela Tabela 6, vê-se que não foi possível identificar qual dos grupos apresentou idade estatisticamente diferente (todos com $p > 0,05$), mas a diferença previamente visualizada parece ser devido ao grupo de pacientes com outras doenças neurológicas, que foi em média mais velho que os demais grupos ($p = 0,053$ e $p = 0,071$).

A dosagem do IgG anti VCA EBV foi estatisticamente maior no grupo EM quando comparado ao grupo controle saudável ($p = 0,024$) e a expressão de HERV-W(*fold change*) basal foi estatisticamente menor nos controles saudáveis que nos grupos de pacientes, tanto EM como outras doenças neurológicas ($p = 0,001$ e $p = 0,022$).

Tabela 6 - Resultado das comparações múltiplas entre os grupos para as características que diferiram entre eles.

Variável	Comparação	Diferença média	Erro padrão	p
Idade (anos)*	Controle VS Outras doenças neurológicas	-10,01	4,14	0,053
	Controle VS Esclerose múltipla	-0,69	3,94	>0,999
	Outras doenças neurológicas VS Esclerose múltipla	9,32	4,05	0,071
Valor Z				
IgG EBV (UI/ml)	Controle VS Outras doenças neurológicas	-1,64		0,101
	Controle VS Esclerose múltipla	-2,25		0,024
	Outras doenças neurológicas VS Esclerose múltipla	-0,61		0,540
T0 Fold Change	Controle VS Outras doenças neurológicas	-3,35		0,001
	Controle VS Esclerose múltipla	-2,29		0,022
	Outras doenças neurológicas VS Esclerose múltipla	1,28		0,200

Comparações múltiplas de Dunn; * Comparações múltiplas de Bonferroni

As Figuras 6 e 7 ilustram através de bloxplot a diferença de expressão entre os grupos do anti- IgG VCA EBV e do *fold change* do HERV-W.

Figura 6- Boxplot mostrando a comparação entre os títulos de IgG EBV entre controles saudáveis, controle outras doenças neurológicas e pacientes EM.

Figura 7 - Comparação entre os grupos EM, Indivíduos Saudáveis (Controle) e Outras doenças neurológicas (ODN) segundo a expressão do HERV-W analisada através do *fold change*.

Tabela 7 - Descrição da dosagem do IgG EBV e da expressão do HERV-W (*fold change*) basal segundo os subgrupos de doenças dentro o ODN e resultado dos testes comparativos.

Variável	Subgrupo					p
	Parkinson (N = 6)	Cefaléia (N = 5)	Epilepsia (N = 6)	(N = 5)	Miscelânea (N = 6)	
IgG EBV (U/ml)						0,260
média ± DP	1208,4 ± 394,3	1279,7 ± 372,6	1493,5 ± 316,6	908 ± 641,6	1171,7 ± 175,7	
mediana (min.; máx.)	1211,3 (576,5; 1648,9)	1369,3 (665; 1568,3)	1589,6 (864,5; 1736,5)	961,4 (0; 1655)	1099,6 (997; 1415,7)	
T0 Fold Change						0,307
média ± DP	5,6 ± 2,1	5,1 ± 0,7	8,6 ± 3,8	9,4 ± 4,6	9,2 ± 6,2	
mediana (min.; máx.)	5,5 (2,5; 8,3)	5,3 (4; 5,7)	8,7 (3,6; 13,1)	9,7 (2,4; 14,3)	7,2 (3,6; 20,5)	

Teste Kruskal-Wallis

A Tabela 7 mostra que a quantificação do IgG anti-VCA EBV e a expressão do HERV-W (*fold change*) basal não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de ODN ($p > 0,05$).

Para essa análise agrupamos os pacientes que apresentavam Polineuropatia Periférica (n=2); Doença de Pompe (n=1); Polineuropatia inflamatória desmielinizante crônica (PDIC)(n=1); Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)(n=1) e Miastenia Gravis (n=1) como um único grupo de miscelânea pois essas patologias apresentavam apenas 2 ou 1 representantes cada.

Tabela 8 - Descrição das características de evolução da doença durante o seguimento.

Variável	Descrição
T 0 EDSS	
média ± DP	3,5 ± 2,4
mediana (mín.; máx.)	2,5 (0; 8)
T 0 surto	
0	22 (66,7)
1	10 (30,3)
4	1 (3)
T 0 RM T2	
0	18 (60)
1	1 (3,3)
3	11 (36,7)
T 0 RM Gd	
0	22 (73,3)
1	4 (13,3)
3	3 (10)
7	1 (3,3)
T 0 Medicamento	
N	11 (34,4)
F	3 (9,4)
TMO	1 (3,1)
G	1 (3,1)
C	4 (12,5)
A	1 (3,1)
B	9 (28,1)
ST	1 (3,1)
MTX	1 (3,1)
T 6 EDSS	
média ± DP	3,8 ± 2,4
mediana (mín.; máx.)	2,8 (0; 7,5)
T 6 surto	
0	26 (89,7)
1	3 (10,3)
T 6 Medicamento	
N	12 (40)
F	2 (6,7)
TMO	1 (3,3)
G	1 (3,3)
C	3 (10)
A	1 (3,3)
B	7 (23,3)
ST	2 (6,7)
MTX	1 (3,3)
T 12 EDSS	
média ± DP	3,8 ± 2,5
mediana (mín.; máx.)	2,8 (0; 8)
T 12 surto	
0	28 (87,5)
1	4 (12,5)
T 12 RM T2	
0	23 (79,3)
1	1 (3,4)
3	5 (17,2)
T 12 RM Gd	
0	26 (89,7)
1	3 (10,3)
T 12 Medicamento	
N	14 (45,2)
F	2 (6,5)
TMO	1 (3,2)
G	1 (3,2)
C	3 (9,7)
A	1 (3,2)
B	5 (16,1)
ST	3 (9,7)
MTX	1 (3,2)

Legenda: N- natalizumabe; F- Fingolimode; TMO- Transplante de medula óssea; G- Acetato de Glatiramer; A- Azatioprina; B- betainterferon; ST- Sem tratamento; MTX- mitoxantrone.

Tabela 9 - Descrição da expressão do HERV-W (*fold change*) basal segundo cada característica de interesse e resultado dos testes comparativos e correlação com idade e tempo de doença nos pacientes EM.

Variável											p
Tipo EM	RR	PP	SP								0,460
média ± DP	7,1 ± 5	4,2 ± 0,9	8 ± 9,9								
mediana (mín.; máx.)	6,6 (0,6; 22,1)	4,3 (3,1; 5)	4,5 (1,9; 31,9)								
T 0 Medicamento	N	F	TMO	G	C	A	B	ST	MTX	0,664	
média ± DP	10,4 ± 9,5	3,1 ± 1,4	5 ± 0	3,3 ± 0	5,5 ± 3,3	4,8 ± 0	6 ± 2,6	3,8 ± 0	4,8 ± 0		
mediana (mín.; máx.)	6,6 (1,9; 31,9)	3,1 (1,7; 4,6)	5 (5; 5)	3,3 (3,3; 3,3)	6,8 (0,6; 7,8)	4,8 (4,8; 4,8)	6,3 (2; 10,4)	3,8 (3,8; 3,8)	4,8 (4,8; 4,8)		
T 0 EDSS	≤ 3	> 3 a 6	> 6								0,223
média ± DP	7,4 ± 4,9	4,5 ± 2,1	7,2 ± 10,2								
mediana (mín.; máx.)	6,6 (1,7; 22,1)	3,8 (2,2; 7,8)	4,5 (0,6; 31,9)								
T 0 Surto	Não	Sim									0,920*
média ± DP	7,5 ± 7,2	5,8 ± 3,4									
mediana (mín.; máx.)	5,2 (1,7; 31,9)	6,2 (0,6; 13,6)									
T 0 RM T2	Não	Sim									0,232*
média ± DP	8,2 ± 7,7	4,5 ± 2,6									
mediana (mín.; máx.)	5,2 (1,9; 31,9)	4,2 (0,6; 7,8)									
T 0 RM Gd	Não	Sim									0,447*
média ± DP	7,5 ± 7,2	4,6 ± 2,4									
mediana (mín.; máx.)	5,2 (1,7; 31,9)	4,6 (0,6; 7,6)									
Tempo de doença (meses)											
correlação	-0,029										0,789
Idade (anos)											
correlação	-0,027										0,881

Teste Kruskal-Wallis; * Teste Mann-Whitney; Correlação de Spearman

A Tabela 9 mostra que a expressão do HERV-W basal não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as categorias das características clínicas e imagiológicas avaliadas ($p > 0,05$). O tempo de doença e a idade também não apresentaram correlação estatisticamente significativa quanto à expressão do HERV-W (*fold change*) basal ($p > 0,05$).

p=0,996

Figura 8- Perfil de expressão do HERV-W (*fold change*) ao longo do seguimento - com ou sem alteração na RM T2.

p=0,997

Figura 9- Perfil de expressão do HERV-W (*fold change*) ao longo do seguimento – com ou sem alteração na RM Gd.

Figura 10- Perfil de expressão do HERV-W (*fold change*) ao longo do seguimento – com ou sem surtos.

Figura 11- Perfil de expressão do HERV-W (*fold change*) ao longo do seguimento – com ou sem piora no EDSS.

Figura 12- Perfil de expressão do HERV-W (*fold change*) ao longo do seguimento – com ou sem alteração em algum dos critérios.

As Figuras 8 a 12 sugerem que a atividade de HERV-W (*fold change*) diminuiu ao longo do seguimento e parece que o seu valor basal foi menor nos pacientes que apresentaram surto. Entretanto esse dado não apresenta diferença estatística significativa na análise longitudinal se mostrando apenas no T0.

Tabela 10- Descrição do *fold change* do HERV-W segundo evolução pelos critérios adotados e ao longo do seguimento e resultado dos testes comparativos.

Variável	Momento			P Critério	P Momento	P Interação
	T 0	T 6	T 12			
Alteração RM T2 no seguimento				0,770	0,843	0,996
Não						
média ± DP	8,03 ± 7,09	5,77 ± 8,43	1,59 ± 4,32			
mediana (mín.; máx.)	6,63 (0,55; 31,94)	0,56 (0,07; 32,67)	0,38 (0,11; 17,05)			
Sim						
média ± DP	3,31 ± 1,27	2,33 ± 3,17	0,24 ± 0,24			
mediana (mín.; máx.)	3,55 (1,73; 4,57)	0,52 (0,04; 7,54)	0,17 (0,01; 0,6)			
Alteração RM Gd no seguimento				0,940	0,944	0,997
Não						
média ± DP	7,48 ± 6,85	5,27 ± 7,98	1,38 ± 3,95			
mediana (mín.; máx.)	5,82 (0,55; 31,94)	0,51 (0,07; 32,67)	0,38 (0,11; 17,05)			
Sim						
média ± DP	3,42 ± 1,39	2,72 ± 4,19	0,03 ± 0,03			
mediana (mín.; máx.)	3,83 (1,87; 4,57)	0,58 (0,04; 7,54)	0,03 (0,01; 0,05)			
Surto no seguimento				0,777	0,863	0,802
Não						
média ± DP	7,9 ± 6,57	4,94 ± 8,09	1,43 ± 4,07			
mediana (mín.; máx.)	6,47 (2,23; 31,94)	0,51 (0,07; 32,67)	0,38 (0,05; 17,05)			
Sim						
média ± DP	3,39 ± 2,43	4 ± 3,29	0,32 ± 0,27			
mediana (mín.; máx.)	2,04 (0,55; 6,73)	4,61 (0,04; 7,54)	0,34 (0,01; 0,58)			
Piora no EDSS				0,820	0,500	0,895
Não						
média ± DP	7,78 ± 6,47	4,76 ± 8,07	1,6 ± 4,32			
mediana (mín.; máx.)	6,63 (0,55; 31,94)	0,48 (0,07; 32,67)	0,38 (0,11; 17,05)			
Sim						
média ± DP	5,41 ± 5,9	4,47 ± 6,52	0,26 ± 0,22			
mediana (mín.; máx.)	3,27 (1,73; 22,14)	0,75 (0,04; 16,7)	0,26 (0,01; 0,52)			
Piora por qualquer critério				0,705	0,415	0,849
Não						
média ± DP	8,64 ± 6,85	5,19 ± 8,69	1,75 ± 4,64			
mediana (mín.; máx.)	6,81 (3,09; 31,94)	0,51 (0,07; 32,67)	0,38 (0,11; 17,05)			
Sim						
média ± DP	5,13 ± 4,99	4,27 ± 5,78	0,35 ± 0,24			
mediana (mín.; máx.)	4,2 (0,55; 22,14)	0,75 (0,04; 16,7)	0,42 (0,01; 0,6)			

EEG com distribuição Normal e função de ligação logarítmica

A Tabela 10 mostra que o *fold change* do HERV-W apresentou comportamento médio estatisticamente igual ao longo do seguimento entre as categorias de alteração dos critérios adotados (p Interação $> 0,05$), não houve diferença média do *fold change* entre os momentos avaliados ($p > 0,05$) e não houve diferença estatisticamente significativa entre quem apresentou piora e quem não apresentou piora pelos critérios adotados ($p > 0,05$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo baseou-se primeiramente na extensa literatura internacional bem como os trabalhos prévios do nosso grupo que correlacionam a presença do HERV-W a pacientes com EM. Dentro dos conceitos da etiologia viral e dos preceitos genéticos, a busca por um agente etiológico que pudesse explicar ambas questões se torna uma tarefa de grande entusiasmo. Entretanto vale ressaltar que o HERV-W não é o primeiro agente infeccioso a ser investigado no contexto da EM, como já apresentamos na introdução, e arrisco dizer que não será o último. Além disso, um vírus endógeno, que demanda diversas interações gênicas para se expressar, mesmo que se apresente em pacientes com uma determinada doença, necessita de muita investigação para defini-lo como sendo causa, consequência, epifenômeno ou um viés.

5.1 O pareamento entre os grupos

Uma questão a ser apontada e discutida é a idade dos grupos. Os pacientes com EM e os pacientes com outras doenças neurológicas foram randomizados cegamente para serem inseridos no estudo. A idade média no mundo dos pacientes com EM no momento do diagnóstico é de 29,2 anos¹⁷ e nossos pacientes apresentaram média de idade no momento do estudo de 41,8 anos e média de tempo de diagnóstico de 60,9 meses. Como trabalhamos com uma população atendida pelo SUS, infelizmente é comum a demora no diagnóstico da EM. Ainda, aqui não descrevemos qual foi o primeiro sintoma, e sim, quando foi o diagnóstico, pois julgamos se tratar de um dado mais concreto.

De qualquer modo, apesar do grupo EM ter apresentado uma média de idade um pouco elevada para estudos em EM, a nossa amostra se encontra dentro da faixa esperada de idade nessa doença. O grupo controle de indivíduos saudáveis foi pareado quanto à idade ao grupo EM mas os pacientes com outras doenças neurológicas apresentaram uma idade média de 51,1 anos, devido à própria característica das outras doenças neurológicas não inflamatórias prevalecerem em idades mais avançadas. Na avaliação estatística a idade do grupo dos pacientes com outras doenças neurológicas não mostrou diferença estatística significativa, mas é importante entendermos que existe uma tendência desse grupo ser mais velho que os demais. Quando avaliamos se a idade influenciava a expressão relativa do HERV-W não encontramos relação entre essas variáveis na comparação múltipla entre os grupos.

A proporcionalidade de gênero se manteve muito semelhante nos 3 grupos estudados. Frente à esses dados consideramos que o pareamento dos grupos foi satisfatório para as análises realizadas no presente estudo.

5.2 A presença do HERV-W em pacientes com EM e em outras doenças

Logo, nosso primeiro dado importante torna-se a presença do *fold change* do HERV-W nos pacientes com EM em valores superiores ao grupo controle de indivíduos saudáveis com diferença estatisticamente significativa, confirmando os dados da literatura.

Desde que Hervé Perron, um virologista francês, em 1989 identificou a presença de um retrovírus endógeno, que hoje sabemos ser o HERV-W, em pacientes com EM¹⁷⁰, iniciou-se a fase da investigação desses elementos. Em 1997, o próprio Hervé Perron se une com o *Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*, que é um grupo de estudo *ad hoc* de variados centros da Europa para fornecer amostras e dados clínicos para grandes estudos em EM e publica um estudo no qual mostra através de ELISA dos produtos de PCR do liquor que 5 entre 10 pacientes com EM apresentaram HERV-W e nenhum dos grupos controles ou com outras doenças neurológicas apresentava¹⁸⁰.

Perron *et al.*¹⁸⁰, inclusive sugere que o HERV-W havia sido encontrado em 5 de 7 pacientes sem uso de terapias imunossupressoras e que os pacientes que estavam em uso ou que haviam usado previamente terapia imunossupressora não se encontrou HERV-W. Este estudo é especialmente importante para nós, pois os pacientes do seu grupo controle apresentavam doença neurológica, e nenhum deles expressou o HERV-W (na época conhecido por MSRV), pesquisado no RNA do liquor, por ELISA. As doenças pesquisadas foram: 1) Atrofia cerebelar; 2) Mielite viral; 3) 3 pacientes com Encefalite Viral; 4) Síndrome de Guillain- Barret; 5) Doença cerebrovascular; 6) Hidrocefalia; 7) Tumor cerebral; 8) Epilepsia.

Desde então foram realizadas diversas pesquisas do HERV-W em pacientes com EM, em diferentes substratos como PBMC, plasma/ soro e liquor com grupo controle e resultados positivos através das técnicas de PCR em tempo real, citometria de fluxo e ELISA pelos grupos de pesquisa franceses^{174,203-206}, sardo^{175,207-209}, polonês²¹⁰, espanhol²¹¹, sul-africano²¹², dinamarquês²¹³, alemão^{182,214}, e canadense^{215,216}, além do nosso próprio grupo de pesquisa¹⁹⁴.

A formação desses grupos de pesquisa foi importante para o entendimento desse tema inovador e que desafiava os pesquisadores com conhecimentos de neurologia, virologia, imunologia e genética e culminaram com diversas reuniões e *workshops*, dos quais nosso grupo participava, sobre o assunto para melhor entendimento e debate entre os pesquisadores de todo o mundo²¹⁷.

Vale ressaltar que, apesar da maioria dos estudos terem mostrado uma quantidade maior de HERV-W em sangue periférico comparado com controles, nem todos os estudos encontraram correlação positiva. Laufer *et al.*²¹⁴ em uma análise de atividade transcricional de HERV-W em sangue periférico não encontrou diferenças entre o grupo controle e o de estudo, sugerindo que a expressão é fruto de uma recombinação de múltiplas regiões truncadas do DNA. Antony *et al.*²¹⁵ encontrou maior expressão gênica em tecido cerebral, mas não em leucócitos de sangue periférico - análise de expressão do envelope de HERV, por PCR.

O segundo dado importante dessa tese, e provavelmente o dado mais inesperado e curioso é a presença também de um *fold change* do HERV-W em outros pacientes com doenças neurológicas em valores superiores ao grupo controle com diferença estatisticamente significativa. Até o presente momento, esse dado nunca foi apresentado e deve modificar o entendimento da ciência nesse ramo.

De fato foram realizados alguns estudos que continham grupo controle com outras doenças neurológicas. Dolei *et al.*²⁰⁹ pesquisou o pool do HERV-W em plasma de 39 pacientes com EM, 35 pacientes com outras doenças neurológicas e 35 pessoas saudáveis a partir de banco de sangue. Esse estudo mostrou maior carga de HERV-W em pacientes com EM do que em ambos grupos $p < 0,01$ e também viu que o grupo de pacientes com outras doenças neurológicas possuía uma carga viral maior do que o grupo controle $p < 0,01$. Esse estudo é o que mais se aproxima do que encontramos, entretanto, a conclusão do trabalho ficou muito focada no fato de haver mais HERV-W em pacientes com EM do que nos outros grupos e deixando de lado o fato de que outras doenças neurológicas também estavam expressando exacerbadamente esse novo retrovírus.

Arru *et al.*¹⁷⁶ realizou um trabalho multicêntrico no qual reuniu 149 pacientes com EM, pacientes com doenças neurológicas e controles saudáveis da Sardenha, norte da Itália, Espanha e Suécia e pesquisou através de PCR em tempo real os genes pol e env do HERV-W no liquor e plasma. Em seu estudo a média do número de cópias por ml, no plasma de pacientes com EM foi 2527 e no LCR foi de 3190, enquanto que pacientes com outras doenças neurológicas mostraram: no plasma 256 e no LCR 293; e nos controles saudáveis, no plasma 327, obtendo $p < 0,001$ na comparação com ambos grupos. Esse resultado refutou a ideia apresentada anteriormente por Dolei e mostra resultados diferentes dos nossos.

Alvarez-Lafuente *et al.*²¹¹ pesquisou diversos vírus, entre eles o HERV-W, por PCR em tempo real no DNA viral, extraído do LCR, em pacientes com EM, pacientes com outras doenças neurológicas e grupo controle saudável mas não encontrou em nenhum dos grupos a

presença do HERV-W. Os próprios autores atribuíram esse resultado como uma falha metodológica e concluem que a pesquisa de partículas virais livres não é a melhor técnica no estudo de retrovírus endógenos.

O grupo de Henrik Clausen, em Copenhague, uniu-se ao Dr. Perron e realizaram uma parceria com o Banco de Cérebro Nacional de Los Angeles em 1995. Eles então publicam a presença de múltiplos retrovírus endógenos em tecido cerebral e em PBMC com expressão semelhante em pacientes com EM, controles saudáveis e 5 pacientes com outras doenças neurológicas sendo: panencefalite esclerosante subaguda, doença de Parkinson, Miastenia gravis, tumor cerebral e linfoma primário do SNC. Entretanto nesse estudo não pesquisaram HERV-W, apenas outros retrovírus endógenos mais conhecidos na época.

Essa discussão toda nos mostra como é essencial o entendimento das diferentes técnicas para se estudar um determinado agente e como a evolução de diferentes técnicas também leva a uma evolução no entendimento de um determinado tema.

De fato, já foi pesquisada e confirmada a presença do HERV-W em pacientes com outras doenças neurológicas. Os estudos mais robustos nesse tema mostram uma associação com esquizofrenia. Inicialmente, a presença do HERV-W foi descrita pelas diferenças no genoma de um paciente com esquizofrenia quando comparado com seu irmão gêmeo monozigótico que não tinha a doença²¹⁸. A partir daí muitos estudos procuraram o RNA viral no LCR e no plasma e confirmaram essa expressão em uma porcentagem de pacientes com esquizofrenia. Quando comparados com outros retrovírus endógenos, apenas o HERV-W mostrou expressão relevante²¹⁹⁻²²². Frank *et al.*²²³ realizou uma investigação em 215 amostras de tecido cerebral de pacientes esquizofrênicos e não encontrou relevância estatística quando comparada com grupo controles. Outra doença cujos estudos mostraram diferença estatística significativa foi o transtorno bipolar²⁰⁴.

Existe também um estudo que encontrou a presença desse vírus em líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e em pacientes com gota, mas apenas em 2 amostras entre 10 pesquisados do primeiro grupo e 1 amostra de 1 pesquisado no segundo²²⁴.

Faucard *et al.* apresenta um artigo no qual ele sugere que a PDIC pode estar associada a presença do HERV. O estudo realizado em 50 pacientes mostrou aumento significativo de env e pol do HERV-W, além de aumento da prevalência da positividade de IL6 e níveis de CXCL10 em pacientes com PDIC quando comparados com doadores de sangue saudáveis e pacientes com outras doenças neurológicas. Além disso a proteína do Env do HERV-W foi encontrada em biópsias nas células de Schwann em 5/7 pacientes com PDIC. Além disso esse estudo mostra que células de Schwann humanas transfectadas com HERV-W apresentavam

aumento significativo de IL6 e CXCL10. Apesar desse artigo não ter entusiasmado a comunidade científica e não termos tido outras investigações de HERV-W em PDIC, ficou claro o papel desse retrovírus na cascata inflamatória através de estimulação de citocinas e quimiocinas de atração linfocitária²²⁵.

De fato, no momento da publicação desse artigo já tínhamos coletado nosso grupo de pacientes com outras doenças neurológicas e coletamos apenas 1 paciente com PDIC, escolhido cegamente entre os pacientes que frequentam os ambulatórios de neurologia da Santa Casa que apresentou expressão relativa de 3,64 do HERV-W muito abaixo da média dos pacientes com outras doenças neurológicas de 7,61 e se assemelhando ao grupo de controles saudáveis de 3,27. Mas nosso estudo não foi desenhado para investigar esse dado. Vale também lembrar que um dos critérios de exclusão era a presença de doença inflamatória do SNC para o grupo de outras doenças neurológicas na tentativa de impedir vieses e não imaginávamos que poderia haver uma associação do HERV-W com doenças neurológicas periféricas ou não inflamatórias na ocasião.

De fato, o papel do HERV-W no processo inflamatório merece um olhar mais atento. Temos outras evidências que a proteína do *env* do HERV-W é um indutor potente da ativação da imunidade inata e adquirida e subsequente liberação de citocinas pró inflamatórias. Rolland *et al.*²²⁶ mostrou o efeito do env HERV-W levando a um efeito agonista inicial através do *Toll-like receptor 4 in vitro* e *in vivo* em modelo experimental de camundongos e estimulando células dendríticas a apoiar a resposta Th1 imunológica. Um efeito secundário “superantigênico” induzindo a ativação policlonal de linfócitos T perpetuando a resposta inflamatória também tem sido proposto¹⁷³.

Além dessas citadas, outros artigos têm estudado a influência do HERV-W em citocinas e quimiocinas inflamatórias e seu papel nessa cascata. Duperray *et al.*²²⁷, mostra como esse retrovírus causa superexpressão de fatores de adesão leucocitários levando a aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica e aumento da produção de IL-6 e IL-8, o que pode justificar o fato de que pacientes com EM apresentam altas cargas de HERV-W em volta das lesões desmielinizantes²⁰⁶.

Além disso, a interação entre *Toll-like receptor 4* e ao aumento da expressão de fatores pró-inflamatórios, em particular a óxido nítrico sintetase, leva a formação de *clusters* nitrogenados, que afetam diretamente a expressão da mielina e a capacidade de remielinização ao bloquear a diferenciação das células precursoras de oligodendrócitos²²⁸.

Todos esses estudos prévios explicam a interação entre o HERV-W e as doenças inflamatórias e auto-imunes do SNC e, de fato, pouco conhecemos sobre como esse elemento

pode influenciar ou ser expresso frente a doenças de outras etiologias. Quando observamos a alta carga de expressão relativa que nossos pacientes com outras doenças neurológicas apresentam muitas questões e ideias surgem.

Uma hipótese que poderia ser formulada é que a expressão do HERV-W é resultado de lesão em SNC, entretanto quando analisamos as doenças neurológicas pesquisadas, nem todas apresentam lesão neurológica central, como polineuropatia periférica, que mostraram altos valores de *fold change* do HERV-W. Apesar do estudo não ter sido desenhado para se pesquisar a diferença entre cada doença neurológica e não ter mostrado diferença estatisticamente significativa entre as diferentes doenças neurológicas pesquisadas, chama a atenção como AVC e doenças neurológicas periféricas mostram valores médios maiores até do que EM.

Recentemente, um estudo foi publicado associando altas frequências de HERV-W em pacientes com diabetes mellitus tipo 1²²⁹. O fato do HERV-W ter sido encontrado em doenças em diferentes sistemas do organismo pode levar ao entendimento que sua presença está associada a mais mecanismos fisiopatológicos do que compreendíamos previamente, e que pode estar envolvido em diversas situações com disfunção tecidual.

5.3 A presença de infecção prévia pelo EBV e seus títulos de anticorpo

Em nosso estudo foram evidenciados maiores títulos de anti-VCA IgG no grupo EM, quando comparados aos do grupo de controles saudáveis. Estudos prospectivos da literatura em que foram avaliados outros anticorpos tanto da fase replicativa como os EA-D quanto latente tipo EBNA_s, mostraram elevação dos níveis de anticorpos contra antígenos do vírus com significância estatística, no grupo de pacientes com EM¹⁴⁸. Porém, em nosso estudo, o aumento relativo dos títulos de IgG VCA não foram relacionados com maior atividade de doença.

Estes achados são compatíveis com resultados de grandes estudos prospectivos, que mostraram ausência de associação entre níveis IgG VCA e EBNA-1 e progressão clínica, presença de marcadores de atividade de RM ou conversão de CIS para EM^{230,231}.

Apesar destes achados, alguns estudos mostraram associação entre anticorpos IgG VCA com progressão de EDSS e número cumulativo de lesões em T2 e com captação de Gd²³². No presente estudo o número de lesões em T2 e com captação de Gd tampouco teve correlação com títulos de IgG VCA.

Na literatura, um estudo de Levin e colaboradores (2005) mostrou uma associação entre EM e os níveis de anti- EBNA_c e EBNA1 IgG . Nessa pesquisa, nos indivíduos que

desenvolveram EM, os níveis de anti- EBNAc foram similares aos controles com idade inferior a 20 anos, mas 2-3 vezes maior entre indivíduos de 25 anos ou mais. O estudo mostrou que um aumento de 4 vezes nos títulos de anti- EBNAc ou EBNA1 foi associado ao aumento em 3 vezes no risco de EM²³³. A elevação simultânea de títulos de IgG VCA e EBNA-1 sugere infecção primária recente ou reativação de infecção acompanhada de resposta imune celular vigorosa. No presente estudo, não foram avaliados os níveis de EBNA-1 e anti EBNA-c por serem marcadores mais envolvidos com a primo infecção e, portanto mais utilizados em estudos realizados em crianças ou comparação de idade.

O IgG anti EBV não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos de doenças neurológicas ($p > 0,05$).

A importância do estudo concomitante do HERV-W e dos anticorpos contra EBV reside na teoria formulada de que o EBV ativaria e estimularia a superexpressão de HERV, levando a atividade inflamatória da EM, que se retroalimentava pela imortalização causada nos linfócitos pela infecção do EBV¹⁹⁷. Todavia, nossos achados refutam essa ideia por não mostrar a correlação direta da atividade de doença com a expressão relativa de nenhum desses elementos.

É importante ressaltar que uma possibilidade seria a análise do PCR do EBV juntamente com os outros parâmetros analisados. Nesse sentido é uma limitação do nosso trabalho foi não ter realizado essa correlação, dado que a sorologia é menos sensível para esse tipo de avaliação. Novos estudos devem ser feitos com essa complementação de análise.

5.4 Marcadores de atividade de doença

A análise de fatores associados à atividade de doença é essencial para a prática clínica, no manejo dos pacientes, na escolha dos tratamentos e no entendimento do prognóstico individual.

Realizamos diversas análises na tentativa de encontrarmos uma associação entre os fatores de atividades clínicas como surtos de desmielinização agudas e acúmulo de incapacidade através da escala de EDSS e da atividade imagiológica através da análise do acúmulo de lesões em T2/FLAIR e novas lesões Gd positivas em estudo longitudinal e não encontramos nenhuma correlação positiva.

Até o presente momento, nunca foram realizados estudos dessa natureza para comparação com nossos resultados, mas os estudos já discutidos aqui, como o que mostra o acúmulo de proteína de HERV-W em torno das lesões desmielinizantes, indicavam que poderia haver uma associação entre a expressão relativa desse retrovírus - com ou sem o

aumento da expressão latente de EBV- com a atividade da EM. Entretanto a avaliação longitudinal desses elementos com os dados clínicos dos pacientes não mostrou qualquer associação.

Na avaliação de T0 os pacientes que tinham apresentado surto no último ano tiveram a expressão do HERV inferior aos que não tiveram surto nos últimos 12 meses, mas quando analisamos longitudinalmente, essa correlação não apresentou significância estatística. Outra constatação é que existe uma queda nos valores médios de HERV-W ao longo da análise longitudinal dos pacientes com EM, mas também sem significância estatística.

Quando avaliamos as Figuras de 8 a 12 que contêm as análises longitudinais do HERV-W muito refletimos sobre o que teria levado à queda da expressão relativa do HERV-W ao longo do tempo e se isso poderia ser um viés da técnica laboratorial.

Entretanto as amostras de cada sujeito tiveram seus RNAs extraídos e o PCR realizado em dias diferentes, sendo que inclusive alguns sujeitos tiveram o sangue de T12 colhidos e processados no mesmo dia em que outro sujeito realizava a coleta e processamento de T0. Além disso foi realizado o controle endógeno através do gene do GAPDH das amostras.

Outra questão que deve ser levantada que pode justificar o comportamento de queda do HERV-W ao longo tempo é a troca de medicamento dos pacientes entre T0 e T12. No atual estudo não encontramos uma medicação que seja responsável pela queda dos títulos, mas como desconhecemos a real influência destas drogas na expressão relativa dos HERVs, essa pode ser uma explicação e ao mesmo também uma limitação do estudo.

Quando analisamos individualmente o comportamento da expressão do HERV-W comparativamente com as variáveis de atividade da EM, que podemos observar no anexo C, encontramos os mais variados tipos de comportamento sendo que alguns pacientes com alta atividade de doença tiveram aumento dos níveis de expressão relativa do HERV-W enquanto outros tiveram decréscimo.

Em pacientes sem atividade clínica e imagiológica de doença identificável também encontramos aumentos e quedas na análise longitudinal do HERV-W. O entendimento da análise é de que a expressão relativa do HERV-W é muito variável e que não existe uma correlação com a atividade da EM. Não sabemos ainda quais fatores influenciam a variação do HERV-W e se a flutuação desse parâmetro se dá a médio prazo- semestralmente como pesquisamos ou talvez até em curtos períodos de tempo como de um dia para o outro.

Como já comentado nunca houve estudos para comparar a atividade clínica da EM com os níveis de expressão do HERV-W, mas um grupo desenvolveu um anticorpo monoclonal chamado GNbAC1, cujo objetivo seria tratar EM através da neutralização do

HERV-W. Os resultados do estudo na fase 2b foram apresentados e o desfecho de diminuição da carga lesional através de ressonância magnética em 6 meses não foi atingido. O estudo prossegue por mais 6 meses e está expandindo sua análise para desfechos de regeneração mielínica e capacidade de recuperação de déficits anteriores dos pacientes com EM²³⁴.

5.5 Outros fatores associados

Não encontramos nenhum outro fator que apresentasse alguma relação aparente com a expressão do HERV em nossa análise como gênero, a medicação utilizada, a forma da EM que o paciente apresentava, nem mesmo tempo da doença e EDSS basal.

Na literatura existem alguns relatos de diferenças entre esses elementos apresentados. No estudo já discutido de Perron *et al.*²⁰⁴ existe uma diferença entre o número de cópias de DNA do HERV-W em formas progressivas da EM quando comparadas com forma remittente recorrente, dado que não se confirma no mesmo estudo pela análise do RNA ou da expressão de proteínas. Garcia-Montojo *et al.*¹⁷⁸ encontrou maior expressão de RNA do *env* do HERV-W em pacientes com EMSP quando comparados aos pacientes com EMRR. O mesmo grupo publicou outro artigo onde sugeria que mulheres possuíam maior carga de HERV-W, especialmente quando apresentavam EDSS elevado²³⁵.

Apesar de não termos encontrado diferença entre a expressão relativa do HERV e forma da EM, uma limitação do nosso estudo é a quantidade de pacientes com formas progressivas, que ocorreu de forma randomizada. O número de pacientes com EMSP foi 8, EMPP 4 e EMRR 24, o que é representativo da proporção dos subtipos na população com EM, mas com poucos pacientes com EMPP e EMSP o estudo não tem poder estatístico para responder essa pergunta.

Arru *et al.*²³⁶ publica um artigo que sugere que o natalizumabe induz à inibição da expressão de HERV-W após o uso em 12 meses da medicação. Nosso estudo não foi desenhado para avaliar essa variável tampouco e os pacientes avaliados tinham uma pulverização muito grande das medicações utilizadas. De qualquer modo não encontramos correlação entre a medicação utilizada e o HERV-W.

5.6 Considerações finais

A investigação dos HERVs em EM foi e é ainda de grande importância. Nos estudos da EM torna-se uma responsabilidade moral dos cientistas investigar quando existe a simples possibilidade de encontrarmos um elemento que componha a etiologia da doença- pois ainda

falta entendermos muito a origem da doença- ou um biomarcador- pois até hoje não temos nenhum marcador biomarcador de piora da doença ou resposta ao tratamento.

O fato das pesquisas de HERV-W e EBV em EM necessitar de uma interação de conhecimentos em imunologia, virologia, genética, clínica médica e neurologia traz consigo tanto dificuldades, como grandes oportunidades. Muitas expectativas foram geradas pela comunidade científica durante o desenvolvimento das pesquisas em HERV e EM, conforme era publicada cada evidência de associação entre esses elementos. Entretanto, o entendimento do real papel dos HERVs e do EBV na EM é difícil.

Nosso estudo mostrou resultados negativos no sentido de encontrar uma associação entre a atividade da EM e do HERV-W e EBV, porém nos deparamos com dados que não eram conhecidos como a alta taxa de HERV-W em outras doenças. Concomitante a geração de dados do nosso estudo, outros autores mostraram a presença do HERV-W em diabetes²²⁹ e os resultados parciais do estudo clínico com GNBAC1 foram negativos²³⁴.

O corpo humano tem uma complexidade e quantidade de elementos interagindo em cada processo biológico que pode ser fascinante, mas ao mesmo tempo traz grandes dificuldades para a geração de conhecimento. Em nossa investigação fomos brindados com resultados inesperados que diminuem as evidências da importância dos HERV-W para o desenvolvimento da EM ou como um biomarcador da atividade da EM e as expectativas de um potencial de tratamento a partir desse caminho, mas, por outro lado, abre possibilidades para o entendimento de que esses retroelementos endógenos estejam envolvidos em mais processos patológicos e em vias mais abrangentes do que entendíamos.

É de autor desconhecido que “a ciência é uma arte de verdades transitórias”. Sem contradizer nenhum dado que havia sido apresentado previamente sobre esse tema, entendemos que nosso estudo direciona a comunidade científica para pesquisar outros caminhos nessa área do conhecimento e novos estudos devem ser realizados para elucidar o real papel desses elementos virais na imunologia e genética do corpo humano de modo mais amplo bem como na fisiopatologia e nos mecanismos de desenvolvimento de diversas doenças e não apenas em EM.

6 CONCLUSÃO

Não encontramos nenhuma correlação na avaliação longitudinal entre a atividade clínica e imagiológica da EM com a avaliação quantitativa do HERV-W e do anticorpo anti-EBV no sangue de pacientes com EM.

Os pacientes com EM apresentam valores superiores de anticorpos IgG anti-EBV.

Existe uma expressão relativa de HERV-W aumentada em pacientes com EM e em pacientes com outras doenças neurológicas quando comparados com controles saudáveis.

7 REFERÊNCIAS

1. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol Med*. 2001; 7(3):115-21.
2. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996; 85(3):299-302.
3. Martin R, McFarland HF. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1995; 32(2):121-82.
4. Dyck PJ, Lambert EH. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. II. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in various neuronal degenerations. *Arch Neurol*. 1968; 18(6):619-25.
5. Cruveilhier. On the Motions and Sounds of the Heart. *Prov Med Surg J*. (1840) 1841; 2(46):389-91.
6. CARSWELL R. *Pathological Anatomy. Illustrations of the Elementary Forms of Disease*: Longman. 1838.
7. Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999; 354(1390):1623-34.
8. Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Macieli DR, Callegaro D. Historical aspects of multiple sclerosis. *Rev Neurol*. 2002; 34(4):379-83.
9. Reeves N. *The Complete Tutankhamun: The King, the Tomb, the Royal Treasure*: Thames & Hudson. 1990.
10. Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, Hasan N *et al*. Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA*. 2010; 303(7):638-47.
11. Medaer R. Does the history of multiple sclerosis go back as far as the 14th century? *Acta Neurol Scand*. 1979; 60(3):189-92.
12. Firth. D. *The case of Augustus d'Esté*. Cambridge. 1948.
13. Valerio BC, Nobrega JA, Tilbery CP. Neural conduction in hand nerves and the physiological factor of age. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004; 62(1):114-18.
14. CATEM. Centro de referência. [Internet]. Disponível em: <http://www.catem.com.br/index.php/pag/centro-de-referencia>
15. Brasil. Ministerio da Saude, Secretaria de Atenção a Saude. Secretaria de Ciencia, Tecnologia e Insumos Estrategicos. Portaria Conjunta nº 97 em 2001, Protocolo Clinico e Diretrizes Terapeuticas da Esclerose Multipla. [Internet]. São Paulo (SP): Ministerio da Saude, 2001. [acessado em 23 de outubro de 2018] Disponível em: http://sna.saude.gov.br/legisla/legisla/control_av/SAS_P97_01control_av_g.doc
16. Compston A. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. *Brain*. London. 2006; 129(Pt 3):561-63.
17. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. In. Edited by Organization WH. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. 2008.
18. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV *et al*. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014; 83(11):1022-24.
19. World Health Organization: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. Disponível em: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>
20. Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008; 71(2):129-35.
21. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002; 104(3):182-91.

22. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*. 2010; 9(5):A387-94.
23. Grimaldi LM, Salemi G, Grimaldi G, Rizzo A, Marziolo R, Lo Presti C *et al*. High incidence and increasing prevalence of MS in Enna (Sicily), southern Italy. *Neurology*. 2001; 57(10):1891-93.
24. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007; 61(6):504-13.
25. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007; 61(4):288-99.
26. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2010; 9(6):599-612.
27. Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW. Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013; 324(1-2):10-16.
28. Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan S. The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2013; 84(4):427-32.
29. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. *Arch Neurol*. 1966; 15(3):234-37.
30. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008; 372(9648):1502-17.
31. Greer JM, McCombe PA. Role of gender in multiple sclerosis: clinical effects and potential molecular mechanisms. *J Neuroimmunol*. 2011; 234(1-2):7-18.
32. Trojano M, Lucchese G, Graziano G, Taylor BV, Simpson S, Jr., Lepore V *et al*. Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2012; 7(10):e48078.
33. Wallin MT, Culpepper WJ, Coffman P, Pulaski S, Maloni H, Mahan CM *et al*. The Gulf War era multiple sclerosis cohort: age and incidence rates by race, sex and service. *Brain*. 2012; 135(Pt 6):1778-85.
34. Celius EG, Smestad C. Change in sex ratio, disease course and age at diagnosis in Oslo MS patients through seven decades. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2009; (189):27-29.
35. Khaleeli Z, Ciccarelli O, Manfredonia F, Barkhof F, Brochet B, Cercignani M *et al*. Predicting progression in primary progressive multiple sclerosis: a 10-year multicenter study. *Ann Neurol*. 2008; 63(6):790-93.
36. Ziemssen T, Kern R, Cornelissen C. The PANGAEA study design - a prospective, multicenter, non-interventional, long-term study on fingolimod for the treatment of multiple sclerosis in daily practice. *BMC Neurol*. 2015; 15:93.
37. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996; 46(4):907-911.
38. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ *et al*. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014; 83(3):278-286.
39. Schumacher GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F *et al*. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1965; 122:552-68.
40. Kurtzke JF, Bui Quoc H. Multiple sclerosis in a migrant population. 1. Hospital data. *Eur Neurol*. 1974; 12(1):1-12.
41. Rose AS, Ellison GW, Myers LW, Tourtellotte WW. Criteria for the clinical diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology*. 1976; 26(6 PT 2):20-22.

42. Bauer HJ. Problems of symptomatic therapy in multiple sclerosis. *Neurology*. 1978; 28(9 Pt 2):8-20.
43. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC *et al*. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983; 13(3):227-31.
44. Paty DW, Oger JJ, Kastrukoff LF, Hashimoto SA, Hooge JP, Eisen AA *et al*. MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT. *Neurology*. 1988; 38(2):180-85.
45. Fazekas F, Offenbacher H, Fuchs S, Schmidt R, Niederkorn K, Horner S *et al*. Criteria for an increased specificity of MRI interpretation in elderly subjects with suspected multiple sclerosis. *Neurology*. 1988; 38(12):1822-25.
46. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH *et al*. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain*. 1997; 120 (Pt 11):2059-69.
47. Tintore M, Rovira A, Martinez MJ, Rio J, Diaz-Villoslada P, Brieva L *et al*. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2000; 21(4):702-06.
48. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD *et al*. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001; 50(1):121-27.
49. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L *et al*. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005; 58(6):840-46.
50. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M *et al*. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011; 69(2):292-302.
51. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G *et al*. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018; 17(2):162-73.
52. Sun JB, Olsson T, Wang WZ, Xiao BG, Kostulas V, Fredrikson S *et al*. Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol*. 1991; 21(6):1461-68.
53. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med*. 2001; 194(5):669-76.
54. Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol*. 1989; 124(1):132-43.
55. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH *et al*. Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol*. 2008; 7(9):796-804.
56. Kasper LH, Shoemaker J. Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs the MS immune system. *Neurology*. 2010; 74 Suppl 1:S2-8.
57. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R *et al*. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*. 2000; 192(3):393-404.

58. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A *et al.* Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain*. 2002; 125(Pt 3):538-50.
59. Jilek S, Schluep M, Meylan P, Vingerhoets F, Guignard L, Monney A *et al.* Strong EBV-specific CD8⁺ T-cell response in patients with early multiple sclerosis. *Brain*. 2008; 131(Pt 7):1712-21.
60. Gay D, Esiri M. Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study. *Brain*. 1991; 114 (Pt 1B):557-72.
61. Breij EC, Brink BP, Veerhuis R, van den Berg C, Vloet R, Yan R *et al.* Homogeneity of active demyelinating lesions in established multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2008; 63(1):16-25.
62. Bernard CC, de Rosbo NK. Immunopathological recognition of autoantigens in multiple sclerosis. *Acta Neurol(Napoli)*. 1991; 13(2):171-78.
63. Egg R, Reindl M, Deisenhammer F, Linington C, Berger T. Anti-MOG and anti-MBP antibody subclasses in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2001; 7(5):285-89.
64. Hellings N, Baree M, Verhoeven C, D'Hooghe M B, Medaer R, Bernard CC *et al.* T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J Neurosci Res*. 2001; 63(3):290-302.
65. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Clin Invest*. 1993; 92(6):2602-08.
66. Markovic M, Trajkovic V, Drulovic J, Mesaros S, Stojisavljevic N, Dujmovic I *et al.* Antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2003; 211(1-2):67-73.
67. O'Connor KC, Chitnis T, Griffin DE, Piyasirisilp S, Bar-Or A, Khoury S *et al.* Myelin basic protein-reactive autoantibodies in the serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients are characterized by low-affinity interactions. *J Neuroimmunol*. 2003; 136(1-2):140-48.
68. Sellebjerg F, Christiansen M, Garred P. MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 1998; 4(3):127-31.
69. Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med (Berl)*. 1997; 75(2):77-88.
70. Genain CP, Hauser SL. Creation of a model for multiple sclerosis in *Callithrix jacchus* marmosets. *J Mol Med (Berl)*. 1997; 75(3):187-97.
71. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*. 2006; 129(Pt 8):1953-71.
72. Johns TG, Kerlero de Rosbo N, Menon KK, Abo S, Gonzales MF, Bernard CC. Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis. *J Immunol*. 1995; 154(10):5536-41.
73. Storch MK, Stefflerl A, Brehm U, Weissert R, Wallstrom E, Kerschensteiner M *et al.* Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol*. 1998; 8(4):681-94.
74. Hart BA, van Meurs M, Brok HP, Massacesi L, Bauer J, Boon L *et al.* A new primate model for multiple sclerosis in the common marmoset. *Immunol Today*. 2000; 21(6):290-97.
75. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005; 23:683-747.

76. Centonze D, Muzio L, Rossi S, Cavasinni F, De Chiara V, Bergami A *et al.* Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci.* 2009; 29(11):3442-52.
77. Bruck W, Stadelmann C. Inflammation and degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2003; 24 Suppl 5:S265-67.
78. Silber E, Sharief MK. Axonal degeneration in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 1999; 170(1):11-18.
79. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain.* 2009; 132(Pt 5):1175-89.
80. Coles AJ, Wing MG, Molyneux P, Paolillo A, Davie CM, Hale G *et al.* Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 1999; 46(3):296-304.
81. Molyneux PD, Kappos L, Polman C, Pozzilli C, Barkhof F, Filippi M *et al.* The effect of interferon beta-1b treatment on MRI measures of cerebral atrophy in secondary progressive multiple sclerosis. European Study Group on Interferon beta-1b in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain.* 2000; 123 (Pt 11):2256-63.
82. Goodin DS. Chapter 11 - The epidemiology of multiple sclerosis: insights to disease pathogenesis. In: *Handbook of Clinical Neurology.* Volume 122, edn. Edited by Goodin DS: Elsevier. 2014; 231-66.
83. Hawkes CH, Macgregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler.* 2009; 15(6):661-67.
84. Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M *et al.* Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain.* 2014; 137(Pt 3):770-78.
85. Patsopoulos NA, Bayer Pharma MSGWG, Steering Committees of Studies Evaluating I-b, a CCRA, Consortium AN, GeneMsa, International Multiple Sclerosis Genetics C *et al.* Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol.* 2011; 70(6):897-912.
86. Sawcer S. The major cause of multiple sclerosis is environmental: genetics has a minor role--no. *Mult Scler.* 2011; 17(10):1174-75.
87. Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* 2012; 248(1):87-103.
88. O'Shea JJ, Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity.* 2012; 36(4):542-50.
89. Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? *Curr Med Chem.* 2007; 14(12):1279-89.
90. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F *et al.* Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2009; 18(4):767-78.
91. Frisullo G, Angelucci F, Caggiula M, Nociti V, Iorio R, Patanella AK *et al.* pSTAT1, pSTAT3, and T-bet expression in peripheral blood mononuclear cells from relapsing-remitting multiple sclerosis patients correlates with disease activity. *J Neurosci Res.* 2006; 84(5):1027-36.
92. Liu Y, Holdbrooks AT, De Sarno P, Rowse AL, Yanagisawa LL, McFarland BC *et al.* Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2014; 192(1):59-72.
93. Sarnico I, Lanzillotta A, Benarese M, Alghisi M, Baiguera C, Battistin L *et al.* NF-kappaB dimers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol.* 2009; 85:351-62.

94. Srinivasan M, Lahiri DK. Significance of NF-kappaB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis. *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19(4):471-87.
95. Misterski B, Bohringer S, Klein W, Sindern E, Haupts M, Schimrigk S *et al*. Inhibitors in the NFkappaB cascade comprise prime candidate genes predisposing to multiple sclerosis, especially in selected combinations. *Genes Immun*. 2002; 3(4):211-19.
96. Jurynczyk M, Selmaj K. Notch: a new player in MS mechanisms. *J Neuroimmunol*. 2010; 218; (1-2):3-11.
97. John GR, Shankar SL, Shafit-Zagardo B, Massimi A, Lee SC, Raine CS *et al*. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat Med*. 2002; 8(10):1115-21.
98. Nakahara J, Aiso S, Suzuki N. Factors that retard remyelination in multiple sclerosis with a focus on TIP30: a novel therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2009; 13(12):1375-86.
99. Goris A, Yeo TW, Maranian M, Walton A, Ban M, Gray J *et al*. Novel Olig 1-coding variants and susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006; 77(11):1296-97.
100. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*. 2005; 15(1):11-18.
101. Sosvorova L, Kanceva R, Vcelak J, Kancheva L, Mohapl M, Starka L *et al*. The comparison of selected cerebrospinal fluid and serum cytokine levels in patients with multiple sclerosis and normal pressure hydrocephalus. *Neuro Endocrinol Lett*. 2015; 36(6):564-71.
102. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*. 2007; 447(7143):433-40.
103. Holliday R. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*. 2006; 1(2):76-80.
104. Weber M, Schubeler D. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr Opin Cell Biol*. 2007; 19(3):273-80.
105. Musse AA, Harauz G. Molecular "negativity" may underlie multiple sclerosis: role of the myelin basic protein family in the pathogenesis of MS. *Int Rev Neurobiol*. 2007; 79:149-72.
106. Mastronardi FG, Noor A, Wood DD, Paton T, Moscarello MA. Peptidyl argininedeiminase 2 CpG island in multiple sclerosis white matter is hypomethylated. *J Neurosci Res*. 2007; 85(9):2006-16.
107. Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C *et al*. Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2010; 290(1-2):16-21.
108. Dieker J, Muller S. Epigenetic histone code and autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010; 39(1):78-84.
109. Pedre X, Mastronardi F, Bruck W, Lopez-Rodas G, Kuhlmann T, Casaccia P. Changed histone acetylation patterns in normal-appearing white matter and early multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*. 2011; 31(9):3435-45.
110. Kaeuferle T, Bartel S, Dehmel S, Krauss-Etschmann S. MicroRNA methodology: advances in miRNA technologies. *Methods Mol Biol*. 2014; 1169:121-30.
111. Chang TC, Mendell JT. microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007; 8:215-39.
112. Du C, Liu C, Kang J, Zhao G, Ye Z, Huang S *et al*. MicroRNA miR-326 regulates TH-17 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2009; 10(12):1252-59.

113. Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L. Altered expression of miR-17-5p in CD4⁺ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Eur J Immunol*. 2010; 40(3):888-98.
114. Paraboschi EM, Solda G, Gemmati D, Orioli E, Zeri G, Benedetti MD *et al*. Genetic association and altered gene expression of mir-155 in multiple sclerosis patients. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(12):8695-712.
115. Guerau-de-Arellano M, Smith KM, Godlewski J, Liu Y, Winger R, Lawler SE *et al*. Micro-RNA dysregulation in multiple sclerosis favours pro-inflammatory T-cell-mediated autoimmunity. *Brain*. 2011; 134(Pt 12):3578-89.
116. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006; 296(23):2832-38.
117. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol*. 2008; 194(1-2):7-17.
118. Simpson S, Jr., Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H *et al*. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010; 68(2):193-203.
119. Fetahu IS, Hobaus J, Kallay E. Vitamin D and the epigenome. *Front Physiol*. 2014; 5:164.
120. Joshi S, Pantalena LC, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C *et al*. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol*. 2011; 31(17):3653-69.
121. Ascherio A, Marrie RA. Vitamin D in MS: a vitamin for 4 seasons. *Neurology*. 2012; 79(3):208-10.
122. Maccani MA, Avissar-Whiting M, Banister CE, McGonnigal B, Padbury JF, Marsit CJ. Maternal cigarette smoking during pregnancy is associated with downregulation of miR-16, miR-21, and miR-146a in the placenta. *Epigenetics*. 2010; 5(7):583-89.
123. Toledo-Rodriguez M, Lotfipour S, Leonard G, Perron M, Richer L, Veillette S *et al*. Maternal smoking during pregnancy is associated with epigenetic modifications of the brain-derived neurotrophic factor-6 exon in adolescent offspring. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2010; 153B(7):1350-54.
124. Balmer SE, Hanvey LS, Wharton BA. Diet and faecal flora in the newborn: nucleotides. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 1994; 70(2):F137-40.
125. Bennet R, Nord CE. Development of the faecal anaerobic microflora after caesarean section and treatment with antibiotics in newborn infants. *Infection*. 1987; 15(5):332-36.
126. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(4):1157-70.
127. Barrett E, Ross RP, O'Toole PW, Fitzgerald GF, Stanton C. gamma-Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine. *J Appl Microbiol*. 2012; 113(2):411-17.
128. Forsythe P, Sudo N, Dinan T, Taylor VH, Bienenstock J. Mood and gut feelings. *Brain Behav Immun*. 2010; 24(1):9-16.
129. Quigley EM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2013; 9(9):560-69.
130. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V *et al*. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2014; 63(8):1275-83.

131. Cantorna MT, McDaniel K, Bora S, Chen J, James J. Vitamin D, immune regulation, the microbiota, and inflammatory bowel disease. *Exp Biol Med* (Maywood). 2014; 239(11):1524-30.
132. Manzel A, Muller DN, Hafler DA, Erdman SE, Linker RA, Kleinewietfeld M. Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014; 14(1):404.
133. P M. Sclerose en plaques et maladie infectueuses. *Prog Med*. 1884; 12:287-89.
134. Kominsky S, Amorim, R., Monteiro, E., Abouhana, R., & Coêlho, M. R. C. D.. The influence of epstein-barr virus in systemic lupus erythematosus etiology. *Revista Paraense de Medicina*. 2006; 20:53-55.
135. Ludvigsson J. Why diabetes incidence increases--a unifying theory. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1079:374-82.
136. Lassmann H WH. Experimental models of multiple sclerosis, vol. 3rd. Churchill Livingstone. 1998.
137. Ghezzi A, Martinelli V, Torri V, Zaffaroni M, Rodegher M, Comi G *et al*. Long-term follow-up of isolated optic neuritis: the risk of developing multiple sclerosis, its outcome, and the prognostic role of paraclinical tests. *J Neurol*. 1999; 246(9):770-75.
138. Kurtzke JF. Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6(4):382-427.
139. Kurtzke JF. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1995; 161:23-33.
140. Poser CM. The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol*. 1994; 36 Suppl 2:S180-93.
141. Granieri E, Casetta I. Selected reviews common childhood and adolescent infections and multiple sclerosis. *Neurology*. 1997; 49(2 Suppl 2):S42-54.
142. Casetta I, Granieri E. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *J Neurovirol*. 2000; 6 Suppl 2:S147-51.
143. Hurt C, Tammaro D. Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. *Am J Med*. 2007; 120(10):911 e911-18.
144. Figueiredo L, T, M.. Mononucleose infecciosa. 2009.
145. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*. 2006; 59(3):499-503.
146. Mouritsen CL, Wittwer CT, Reed G, Khan TM, Martins TB, Jaskowski TD *et al*. Detection of Epstein-Barr viral DNA in serum using rapid-cycle PCR. *Biochem Mol Med*. 1997; 60(2):161-68.
147. Lennette ET, Rymo L, Yadav M, Masucci G, Merk K, Timar L *et al*. Disease-related differences in antibody patterns against EBV-encoded nuclear antigens EBNA 1, EBNA 2 and EBNA 6. *Eur J Cancer*. 1993; 29A(11):1584-89.
148. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ *et al*. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001; 286(24):3083-88.
149. Pakpoor J, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: association or causation? *Expert Rev Neurother*. 2013; 13(3):287-97.
150. Almohmeed YH, Avenell A, Aucott L, Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013; 8(4):e61110.
151. Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan SV. Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2010; 6(3):156-66.
152. Pohl D, Krone B, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Lehnert M *etal*. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2006; 67(11):2063-65.

153. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010; 67(6):824-30.
154. DeLorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006; 63(6):839-44.
155. Cocuzza CE, Piazza F, Musumeci R, Oggioni D, Andreoni S, Gardinetti M *et al*. Quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid and blood samples of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014; 9(4):e94497.
156. Villegas E, Santiago O, Carrillo JA, Sorlozano A, Guerrero M, Fernandez O *et al*. Low intrathecal immune response of anti-EBNA-1 antibodies and EBV DNA from multiple sclerosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011; 70(1):85-90.
157. Lindsey JW, Hatfield LM, Crawford MP, Patel S. Quantitative PCR for Epstein-Barr virus DNA and RNA in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2009; 15(2):153-58.
158. Lucas RM, Hughes AM, Lay ML, Ponsonby AL, Dwyer DE, Taylor BV *et al*. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011; 82(10):1142-148.
159. Farrell RA, Antony D, Wall GR, Clark DA, Fisniku L, Swanton J *et al*. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology*. 2009; 73(1):32-38.
160. Lunemann JD, Tintore M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, Caballero E *et al*. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010; 67(2):159-69.
161. Kvistad S, Myhr KM, Holmoy T, Bakke S, Beiske AG, Bjerne KS *et al*. Antibodies to Epstein-Barr virus and MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014; 20(14):1833-40.
162. Zivadinov R, Zorzon M, Weinstock-Guttman B, Serafin M, Bosco A, Bratina A *et al*. Epstein-Barr virus is associated with grey matter atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80(6):620-25.
163. Holmoy T, Vartdal F. Cerebrospinal fluid T cells from multiple sclerosis patients recognize autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Neurovirol*. 2004; 10(1):52-56.
164. Lunemann JD, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R *et al*. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med*. 2008; 205(8):1763-73.
165. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P *et al*. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med*. 2007; 204(12):2899-912.
166. Pender MP, Csurhes PA, Lenarczyk A, Pfluger CM, Burrows SR. Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80(5):498-505.
167. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J *et al*. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409(6822):860-921.
168. Blond JL, Beseme F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H *et al*. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family. *J Virol*. 1999; 73(2):1175-85.
169. Komurian-Pradel F, Paranhos-Baccala G, Bedin F, Ounanian-Paraz A, Sodoyer M, Ott C *et al*. Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles. *Virology*. 1999; 260(1):1-9.

170. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J *et al.* Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol.* 1989; 140(6):551-61.
171. Perron H, Gratacap B, Lalande B, Genoulaz O, Laurent A, Geny C *et al.* In vitro transmission and antigenicity of a retrovirus isolated from a multiple sclerosis patient. *Res Virol.* 1992; 143(5):337-50.
172. Perron H, Perin JP, Rieger F, Alliel PM. Particle-associated retroviral RNA and tandem RGH/HERV-W copies on human chromosome 7q: possible components of a 'chain-reaction' triggered by infectious agents in multiple sclerosis? *J Neurovirol.* 2000; 6 Suppl 2:S67-75.
173. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A *et al.* Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology.* 2001; 287(2):321-32.
174. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *Lancet.* 1998; 351(9095):33.
175. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurol Sci.* 2001; 22(2):171-73.
176. Arru G, Mameli G, Astone V, Serra C, Huang YM, Link H *et al.* Multiple Sclerosis and HERV-W/MSRV: A Multicentric Study. *Int J Biomed Sci.* 2007; 3(4):292-97.
177. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, De las Heras V, Casanova I *et al.* The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS One.* 2013; 8(1):e53623.
178. Garcia-Montojo M, de la Hera B, Varade J, de la Encarnacion A, Camacho I, Dominguez-Mozo M *et al.* HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV. *Retrovirology.* 2014; 11:2.
179. Sotgiu S, Arru G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, Rosati G *et al.* Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Mult Scler.* 2006; 12(6):698-703.
180. Perron H, Firouzi R, Tuke P, Garson JA, Michel M, Beseme F *et al.* Cell cultures and associated retroviruses in multiple sclerosis. Collaborative Research Group on MS. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1997; 169:22-31.
181. Christensen T, Tonjes RR, zur Megede J, Boller K, Moller-Larsen A. Reverse transcriptase activity and particle production in B lymphoblastoid cell lines established from lymphocytes of patients with multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1999; 15(3):285-91.
182. Schmitt K, Richter C, Backes C, Meese E, Ruprecht K, Mayer J. Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing. *J Virol.* 2013; 87(24):13837-852.
183. Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C *et al.* Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *J Neurovirol.* 2003; 9(1):79-93.
184. Perron H, Lang A. The human endogenous retrovirus link between genes and environment in multiple sclerosis and in multifactorial diseases associating neuroinflammation. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2010; 39(1):51-61.

185. Morandi E, Tanasescu R, Tarlinton RE, Constantinescu CS, Zhang W, Tench C *et al.* The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0172415.
186. Lycke J, Svennerholm B, Hjelmquist E, Frisen L, Badr G, Andersson M *et al.* Acyclovir treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *J Neurol*. 1996; 243(3):214-24.
187. Bech E, Lycke J, Gadeberg P, Hansen HJ, Malmstrom C, Andersen O *et al.* A randomized, double-blind, placebo-controlled MRI study of anti-herpes virus therapy in MS. *Neurology*. 2002; 58(1):31-36.
188. Rice GP, Hartung HP, Calabresi PA. Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale. *Neurology*. 2005; 64(8):1336-42.
189. Selter RC, Biberacher V, Grummel V, Buck D, Eienbroker C, Oertel WH *et al.* Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2013; 19(11):1454-61.
190. Ortega-Madueno I, Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I *et al.* Anti-human herpesvirus 6A/B IgG correlates with relapses and progression in multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014; 9(8):e104836.
191. Castellazzi M, Delbue S, Elia F, Gastaldi M, Franciotta D, Rizzo R *et al.* Epstein-Barr Virus Specific Antibody Response in Multiple Sclerosis Patients during 21 Months of Natalizumab Treatment. *Dis Markers*. 2015; 2015:901312.
192. Derfuss T, Curtin F, Guebelin C, Bridel C, Rasenack M, Matthey A *et al.* A phase IIa randomised clinical study of GNBAC1, a humanised monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus in multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2015; 21(7):885-93.
193. Kremer D, Forster M, Schichel T, Gottle P, Hartung HP, Perron H *et al.* The neutralizing antibody GNBAC1 abrogates HERV-W envelope protein-mediated oligodendroglial maturation blockade. *Mult Scler*. 2015; 21(9):1200-03.
194. do Olival GS, Faria TS, Nali LH, de Oliveira AC, Casseb J, Vidal JE *et al.* Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front Microbiol*. 2013; 4:172.
195. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*. 2001; 15(4):579-89.
196. Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT. Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *J Virol*. 2004; 78(14):7852-60.
197. Mameli G, Madeddu G, Mei A, Uleri E, Poddighe L, Delogu LG *et al.* Activation of MSRV-type endogenous retroviruses during infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus latency: the missing link with multiple sclerosis? *PLoS One*. 2013; 8(11):e78474.
198. Olival GS, Lima BM, Sumita LM, Serafim V, Fink MC, Nali LH *et al.* Multiple sclerosis and herpesvirus interaction. *Arq Neuropsiquiatr*. 2013; 71(9B):727-30.
199. Kelsey J. Methods in Observational Epidemiology. In: *Methods in Observational Epidemiology*. Volume Second, edn. Oxford University Press. 1996; 315-22.
200. Kirkwood BJA, J. A. C.. *Medical Statistic*, vol. 2. Massachusetts: Blackwell Science Ltda. 2006.
201. Neter JK, M. H.; Nachtsheim, C. J.; Wasserman, W.. *Applied linear statistical models*., vol. 4. Chicago: Irwin. 1996.
202. P. McCullagh JAN. *Generalized Linear Models*, vol. 2: CRC Publisher. 1989.

203. Menard A, Amouri R, Michel M, Marcel F, Brouillet A, Belliveau J *et al.* Gliotoxicity, reverse transcriptase activity and retroviral RNA in monocyte/macrophage culture supernatants from patients with multiple sclerosis. *FEBS Lett.* 1997; 413(3):477-85.
204. Perron H, Germe R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L *et al.* Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler.* 2012; 18(12):1721-36.
205. Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Sazdovitch V *et al.* Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol.* 2005; 11(1):23-33.
206. van Horssen J, van der Pol S, Nijland P, Amor S, Perron H. Human endogenous retrovirus W in brain lesions: Rationale for targeted therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2016; 8:11-18.
207. Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S *et al.* Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSR_Venv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis. *J Virol Methods.* 2009; 161(1):98-106.
208. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C *et al.* Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *J Gen Virol.* 2007; 88(Pt 1):264-74.
209. Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC *et al.* Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology.* 2002; 58(3):471-73.
210. Nowak J, Januszkiewicz D, Pernak M, Liwen I, Zawada M, Rembowska J *et al.* Multiple sclerosis-associated virus-related pol sequences found both in multiple sclerosis and healthy donors are more frequently expressed in multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 2003; 9(1):112-17.
211. Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Dominguez-Mozo MI, Bartolome M, Benito-Martin MS. Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2008; 14(5):595-601.
212. de Villiers JN, Treurnicht FK, Warnich L, Carr J, van Rensburg SJ, Kotze MJ. Analysis of viral and genetic factors in South African patients with multiple sclerosis. *Metab Brain Dis.* 2006; 21(2-3):163-69.
213. Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, Moller-Larsen A. B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology.* 2009; 6:104.
214. Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N, Ruprecht K. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology.* 2009; 6:37.
215. Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F *et al.* Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(12):1253-59.
216. Antony JM, Zhu Y, Izad M, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F *et al.* Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007; 23(10):1251-56.

217. Nath A, Küry, P., do Olival, G. S., Dolei, A., Karlsson, H., Groc, L.. First international workshop on human endogenous retroviruses and diseases, HERVs & disease. 2015; In.; 2015.
218. Deb-Rinker P, Klempan TA, O'Reilly RL, Torrey EF, Singh SM. Molecular characterization of a MSRV-like sequence identified by RDA from monozygotic twin pairs discordant for schizophrenia. *Genomics*. 1999; 61(2):133-44.
219. Karlsson H, Bachmann S, Schroder J, McArthur J, Torrey EF, Yolken RH. Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(8):4634-39.
220. Karlsson H, Schroder J, Bachmann S, Bottmer C, Yolken RH. HERV-W-related RNA detected in plasma from individuals with recent-onset schizophrenia or schizoaffective disorder. *Mol Psychiatry*. 2004; 9(1):12-13.
221. Yolken RH, Karlsson H, Yee F, Johnston-Wilson NL, Torrey EF. Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000; 31(2-3):193-99.
222. Yao Y, Schroder J, Nellaker C, Bottmer C, Bachmann S, Yolken RH *et al*. Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia. *Genes Brain Behav*. 2008; 7(1):103-12.
223. Frank O, Giehl M, Zheng C, Hehlmann R, Leib-Mosch C, Seifarth W. Human endogenous retrovirus expression profiles in samples from brains of patients with schizophrenia and bipolar disorders. *J Virol*. 2005; 79(17):10890-901.
224. Gaudin P, Ijaz S, Tuke PW, Marcel F, Paraz A, Seigneurin JM *et al*. Infrequency of detection of particle-associated MSRV/HERV-W RNA in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000; 39(9):950-54.
225. Faucard R, Madeira A, Gehin N, Authier FJ, Panaite PA, Lesage C, Burgelin I *et al*. Human Endogenous Retrovirus and Neuroinflammation in Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *EBioMedicine*. 2016; 6:190-98.
226. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses. *J Immunol*. 2006; 176(12):7636-44.
227. Duperray A, Barbe D, Raguenes G, Weksler BB, Romero IA, Couraud PO *et al*. Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4. *Int Immunol*. 2015; 27(11):545-53.
228. Kremer D, Schichel T, Forster M, Tzekova N, Bernard C, van der Valk P *et al*. Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Ann Neurol*. 2013; 74(5):721-32.
229. Curtin F, Bernard C, Levet S, Perron H, Porchet H, Medina J *et al*. A new therapeutic approach for type 1 diabetes: Rationale for GNBAC1, an anti-HERV-W-Env monoclonal antibody. *Diabetes Obes Metab*. 2018; 20(9):2075-84.
230. Simpson S, Jr., Taylor B, Burrows J, Burrows S, Dwyer DE, Taylor J *et al*. EBV & HHV6 reactivation is infrequent and not associated with MS clinical course. *Acta Neurol Scand*. 2014; 130(5):328-37.
231. Giess RM, Pfuhl C, Behrens JR, Rasche L, Freitag E, Khalighy N *et al*. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS One*. 2017; 12(4):e0175279.
232. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamano-Blanco M *et al*. Environmental factors associated with disease progression after the first demyelinating event: results from the multi-center SET study. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53996.

233. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D *et al.* Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA*. 2005; 293(20):2496-500.
234. Hartung, H. P., Curtin, F., Schneble, H. M., Pochet, H., Glanzman, R., Lambert, E. *et al.* Week 24 results from a Phase IIb trial of GNBAC1 in patients with relapsing remitting multiple sclerosis (CHANGE-MS; Clinical trial assessing the HERV-W Env antagonist GNBAC1 for Efficacy in MS). *Mult Scler*. 2017; 23: 980-81.
235. Garcia-Montojo M, Varade J, Villafuertes E, de La Hera B, Hoyas-Fernandez J, Dominguez-Mozo MI *et al.* Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 is associated with clinical severity in osteoarthritis patients. *Scand J Rheumatol*. 2013; 42(6):498-504.
236. Arru G, Leoni S, Pugliatti M, Mei A, Serra C, Delogu LG *et al.* Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study. *Mult Scler*. 2014; 20(2):174-82.

ANEXOS

8 ANEXOS

Anexo A- Aprovação do comitê de ética da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE CLÍNICA E IMAGIOLÓGICA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA E EXPRESSÃO DE RETROVIRUS ENDÓGENO TIPO W E

Pesquisador: Guilherme Sciascia do Olival

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 38201814.9.0000.5479

Instituição Proponente: IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICORDIA DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.740.773

Apresentação do Projeto:

A esclerose múltipla é a doença inflamatória auto-imune mais comum do sistema nervoso central. Sabe-se que sua etiologia é tanto por causas genéticas quanto ambientais. Vários vírus já foram implicados tanto como desencadeadores quanto como perpetuadores desta doença. Vários trabalhos fazem a correlação entre Retrovírus Endógeno tipo W e os da família Herpesviridae com a patogênese e atividade da esclerose múltipla.

As características mais importantes dos vírus implicados na patogênese da doença são o fato de apresentarem períodos de latência e exacerbação e de terem como seu principal ambiente biológico, o sistema nervoso central. Os vírus HERV-W, Epstein-Barr, o citomegalovírus, o herpesvírus tipo 6 e herpesvírus tipo 7 são os membros mais estudados como desencadeadores da esclerose múltipla. Constatou-se que estes vírus estão fortemente envolvidos na patogênese da esclerose múltipla, porém acredita-se que não sejam os únicos responsáveis pelo seu início. É provável que esta doença apresente inúmeros desencadeadores e mais estudos são necessários para determinar estas interações. Além disso, nunca foi realizado um estudo que compare a atividade da esclerose múltipla com a presença desses vírus.

Endereço: SANTA ISABEL

Bairro: VILA BUARQUE

CEP: 01.221-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2176-7689

Fax: (11)2176-7688

E-mail: cepsc@santacasasp.org.br

Continuação do Parecer: 1.740.773

Objetivo da Pesquisa:

Correlacionar a atividade clínica e imagiológica da esclerose múltipla com a avaliação quantitativa do HERV-W e a presença de vírus da família

Herpesviridae no sangue de pacientes com esclerose múltipla. Avaliar através da técnica de imunoensaio e reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) a expressão de HERV-W e de Herpesvirus e comparar a expressão de HERV-W entre os pacientes portadores de esclerose múltipla com controles saudáveis e outras doenças neurológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por ser um estudo observacional, ou seja, sem qualquer tipo de intervenção nos regimes terapêuticos aos quais os pacientes estão submetidos, esse estudo oferece risco médio para os voluntários envolvidos. A coleta de sangue consiste no único procedimento invasivo, considerado risco médio, porque em casos extremos, pode acarretar em hematoma no local da punção, que deve desaparecer em um ou dois dias após a coleta. Não haverá compensação financeira pela participação. A princípio, esse estudo não trará nenhum benefício imediato ao paciente. Entretanto, as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas nas mesmas condições.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Após resultados dos exames laboratoriais, os dados serão analisados e receberão tratamento estatístico necessário para sua interpretação e comparação com a atividade de doença utilizando ferramentas paramétricas e não paramétricas. Os testes t-Student e Mann-Whitney serão empregados para avaliar as associações entre parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais. Será fixado o nível de significância alfa = 0,05 ou 5% para rejeição da hipótese de nulidade. Desfecho Primário: Com esse trabalho espera-se encontrar mais respostas sobre as possíveis etiopatogenias e atividade inflamatória relacionadas à esclerose múltipla, e desta forma, apresentar dados mais consistentes que ajudem a formulação de terapêuticas cada vez mais específicas e eficazes direcionadas a esta patologia

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: APROVADO

Recomendações:

NDN

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

APROVADO

Endereço: SANTA ISABEL
Bairro: VILA BUARQUE CEP: 01.221-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2176-7689 Fax: (11)2176-7688 E-mail: cepsc@santacasasp.org.br

Continuação do Parecer: 1.740.773

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_781098 E2.pdf	23/08/2016 22:53:43		Aceito
Outros	avaliacao_comissao_psico.pdf	23/08/2016 22:38:43	Guilherme Sciascia do Olival	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HERV_PROJETO_atualizado.docx	23/08/2016 22:34:33	Guilherme Sciascia do Olival	Aceito
Outros	AprovacaocomissaoRadio.pdf	07/03/2016 11:38:59	Guilherme Sciascia do Olival	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE- NOVO -OLIVAL.docx	03/03/2015 12:54:10		Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo de compromisso herv.pdf	04/11/2014 00:31:24		Aceito
Declaração de Pesquisadores	formulario orcarn assinado - Herv.pdf	31/10/2014 09:05:18		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto - Herv.pdf	27/10/2014 19:25:01		Aceito
Declaração de Pesquisadores	formulario autorixacoes - Herv.pdf	27/10/2014 19:24:17		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Setembro de 2016

Assinado por:
Paulo Augusto Ayroza Galvão Ribeiro
(Coordenador)

Endereço: SANTA ISABEL
Bairro: VILA BUARQUE **CEP:** 01.221-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2176-7689 **Fax:** (11)2176-7688 **E-mail:** cepsc@santacasasp.org.br

Anexo B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido fornecido aos voluntários da pesquisa

**HOSPITAL DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
DISCIPLINA DE NEUROLOGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE:DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APT

O:

BAIRRO: CIDADE:

CEP:..... TELEFONE: DDD ()......

DADOS SOBRE A PESQUISA

- 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: A EXPRESSÃO DO ENVELOPE
DE RETROVIRUS ENDÓGENO TIPO W NO SANGUE PERIFÉRICO DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA.**

PESQUISADOR : **Dr. GUILHERME SCIASCIA DO OLIVAL**

CARGO/FUNÇÃO: **PESQUISADOR CIENTÍFICO**

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DO ESTUDO: **2 ANOS**

4. DURAÇÃO DO ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES: **12 MESES**

5. DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVO

Estamos realizando um estudo de caráter observacional em indivíduos com Esclerose Múltipla. O objetivo do presente estudo é avaliar a expressão de uma família específica de vírus em pacientes com esclerose múltipla e comparar com pacientes saudáveis ou com outras doenças neurológicas. Esta pesquisa é importante para identificar fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença e para tentar propor tratamentos mais específicos e direcionados. O estudo envolverá a realização de coleta de sangue periférico e envio deste material para um laboratório externo. É importante mencionar que nenhum tipo de interferência será feita por parte do estudo nos regimes terapêuticos que os voluntários estejam recebendo.

6. PROCEDIMENTOS DE PESQUISA

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. O seu acompanhamento e tratamento prosseguirão normalmente a cargo dos médicos que lhe acompanham e não será modificado de maneira alguma caso você decida participar ou não da pesquisa. Além disso, você poderá optar por não participar mais do estudo a qualquer momento, sem que exista qualquer implicação no seu tratamento médico. Caso você aceite participar, será solicitada uma amostra de sangue, cerca de 20 a 30 ml do seu sangue será coletado por punção da veia periférica do membro superior (braço direito ou esquerdo). A coleta será feita por técnico habilitado com materiais esterilizados e descartáveis, de uso único e individual. O seu material e os dados coletados durante este projeto serão utilizados para o estudo da presença do material genético de diferentes vírus, e poderá ser armazenado para posteriores

estudos que envolvam a investigação de outros vírus, bem como características genéticas dos pacientes. Todos os novos ensaios serão previamente comunicados.

7. BENEFÍCIOS E OBRIGAÇÕES DO PARTICIPANTE

Você não terá despesas pessoais por participar desse estudo, e nem qualquer obrigação. Também não haverá compensação financeira por sua participação. A princípio, esse estudo não trará nenhum benefício imediato a você. Entretanto, as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas nas mesmas condições que você.

8. RISCOS PARA O PARTICIPANTE

Por ser um estudo observacional, ou seja, sem qualquer tipo de intervenção nos regimes terapêuticos aos quais os pacientes estão submetidos, esse estudo não oferece riscos para os voluntários envolvidos. A coleta de sangue consiste no único procedimento invasivo, o que pode, em casos extremos, acarretar em hematoma no local da punção, que deve desaparecer em um ou dois dias após a coleta.

9. GARANTIA DE ACESSO AOS PESQUISADORES

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis principais são:

- Guilherme Sciascia do Olival que pode ser encontrado através do endereço eletrônico: guilhermesolival@gmail.com;
- Camila M. Romano, que pode ser encontrada na Rua Eneas de Carvalho Aguiar, 470, prédio IMTI, 2º andar, SP. Tel: 3061-7020, ou pelo endereço eletrônico: cmromano@usp.br.

10. DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. Você

poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, às publicações pertinentes.

CONSENTIMENTO

Eu, abaixo assinado, afirmo que li na íntegra e entendi completamente as informações. Concordo que as informações a respeito de minha condição médica e os resultados obtidos através de meu sangue podem ser utilizados nos estudos. Minha participação é voluntária e livre de qualquer tipo de pressão ou coação. Eu entendo que estas informações serão confidenciais e que meu nome não será mencionado em qualquer publicação deste estudo.

Nome completo do voluntário/representante legal

Data

Assinatura do voluntário/representante legal

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Pesquisadora responsável: Camila Malta Romano

Data

Médico responsável : Guilherme Sciascia do Olival

Data

PERMISSÃO DE ARMAZENAMENTO

Eu, abaixo assinado, afirmo que li na íntegra e entendi completamente as informações. Concordo que as informações a respeito de minha condição médica e os resultados obtidos através de meu sangue podem ser armazenados para que seja possível estudá-los em projetos futuros. Entendo que os pesquisadores deverão entrar em contato comigo caso minha amostra seja utilizada para outro estudo além deste. Minha participação é voluntária e livre de qualquer tipo de pressão ou coação.

Eu entendo que estas informações serão confidenciais e que meu nome não será mencionado em qualquer publicação deste estudo.

Nome completo do voluntário/representante legal

Data

Assinatura do voluntário/representante legal

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Pesquisadora responsável: Camila Malta Romano

Data

Médico responsável : Guilherme Sciascia do Olival

Data

Anexo C- Gráficos com comportamento de surtos, EDSS, novas lesões em T2/FLAIR, novas lesões captando Gd, expressão do HERV-W e IgG contra EBV ao longo do tempo de cada sujeito do estudo.

SUJEITO 7

SUJEITO 8

SUJEITO 9

SUJEITO 10

SUJEITO 11

SUJEITO 12

SUJEITO 13

SUJEITO 14

SUJEITO 15

SUJEITO 16

SUJEITO 17

SUJEITO 18

SUJEITO 19

SUJEITO 20

SUJEITO 21

SUJEITO 22

SUJEITO 23

SUJEITO 24

SUJEITO 25

SUJEITO 26

SUJEITO 27

SUJEITO 28

SUJEITO 29

SUJEITO 30

SUJEITO 31

SUJEITO 32

SUJEITO 33

Anexo D- Produção do aluno

Artigos publicados durante o período do doutoramento e anteriormente de interesse para o assunto

1. Garcia-Rosa, S., Trivella, D. B. B., Marques, V. D., Serafim, R. B., Pereira, J. G. C., Lorenzi, J. C. C., Molfetta G.A., Christo P. P., **Olival G. S.**, Marchitto, V. B. T. (2018). A non-functional galanin receptor-2 in a multiple sclerosis patient. *The Pharmacogenomics Journal*, 1.
2. Garcia-Rosa, S., Amorim, M. G., Valieris, R., Marques, V. D., Lorenzi, J. C. C., Toller, V. B., **Olival G. S.**, ... Barreira, A. A. (2017). Exome sequencing of multiple-sclerosis patients and their unaffected first-degree relatives. *BMC Research Notes*, 10(1), 735.
3. Cavenaghi, V. B., Dobrianskyj, F. M., **Olival, G. S. do**, Carneiro, R. P. C. D., & Tilbery, C. P. (2017). Characterization of the first symptoms of multiple sclerosis in a Brazilian center: cross-sectional study. *Sao Paulo Medical Journal*, 135(3), 222–225.
4. Nali, L. H., Fink, M. C., **do Olival, G. S.**, Moraes, L., Callegaro, D., Tilbery, C. P., ... Romano, C. M. (2017). Polyomavirus detection in multiple sclerosis patients under natalizumab therapy: Profile and frequency of urinary shedding. *Journal of Medical Virology*, 89(3), 528–534.
5. Nali, L. H., da Silva, I. T., **do Olival, G. S.**, Dias-Neto, E., Silva, D. F., Urbano, P. R., ... Romano, C. M. (2016). Profile of HERV-W expression in multiple sclerosis patients. In *MULTIPLE SCLEROSIS JOURNAL* (Vol. 22, pp. 863–864). SAGE PUBLICATIONS LTD 1 OLIVERS YARD, 55 CITY ROAD, LONDON EC1Y 1SP, ENGLAND.
6. Modolo, G. P., & **do Olival, G. S.** (2016). Medication withdrawal in relapsing–remitting multiple sclerosis: why not? *European Journal of Neurology*, 23(4), 679–680.
7. De Oliveira, F. T. M., **do Olival, G. S.**, & de Oliveira, A. C. P. (2015). Central nervous system antiretroviral high penetration therapy. *Journal of AIDS and Clinical Research*, 6(12).
8. Nath, A., Kry, P., **do Olival, G. S.**, Dolei, A., Karlsson, H., Groc, L., ... Mallet, F. (2015). First international workshop on human endogenous retroviruses and diseases, HERVs & disease 2015. BioMed Central.
9. Silva, R. A. P. da, **Olival, G. S. do**, Stievano, L. P., Toller, V. B., Jordy, S. S., Eloi, M., & Tilbery, C. P. (2015). Validation and cross-cultural adaptation of sexual dysfunction modified scale in multiple sclerosis for Brazilian population. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(8), 681–687.
10. Stievano, L. P., **Olival, G. S. do**, Silva, R. A. P. da, Toller, V. B., Carabetta, E. G., Cunha, E. T. S. da, ... Tilbery, C. P. (2015). Validation survey of the impact of urinary incontinence (IIQ-7) and inventory of distress urogenital (UDI-6)–the short scales–in patients with multiple sclerosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 73(1), 46–51.
11. Gaspar, G. L. C., Souza, M. A. S., Masteguim, T., Matta, S., Casseb, J., **Olival, G. S.**, ... Oliveira, A. C. P. (2014). Medical conditions, social and neurological patients of the T-lymphotropic virus humanities-HTLV I. *Retrovirology*, 11(1), P35.
12. Gascn, M. R. P., Mazzaro, Y. M., Capito, C. G., Jardim, V. B. L. F., **Olival, G. S.**, Bermudez, J. V., ... Penalva de Oliveira, A. C. (2014). Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: preliminary data of a comparative study among depression and neurocognitive impairments. *Retrovirology*, 11(1), P32.

13. Nali, L. H. S., **Olival, G. S.**, de Oliveira, A. C. P., Casseb, J., Vidal, J. E., Moraes, L., ... Romano, C. M. (2014). HERV-W/MRSV envelope transcripts detection in blood of multiple sclerosis patients after Natalizumab treatment. *Retrovirology*, 11(1), P131. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-S1-P131>
14. **Olival, G.**, Faria, T., Nali, L. H., de Oliveira, A. C., Casseb, J., Vidal, J. E., ... Romano, C. (2013). Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen . *Frontiers in Microbiology* . Retrieved from <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00172>
15. **Olival, G. S. do**, Lima, B. M., Sumita, L. M., Serafim, V., Fink, M. C., Nali, L. H., ... Tilbery, C. P. (2013). Multiple sclerosis and herpesvirus interaction. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71(9B), 727–730.
16. **Olival, G. S. do**, Cavenaghi, V. B., Serafim, V., Thomaz, R. B., & Tilbery, C. P. (2013). Medication withdrawal may be an option for a select group of patients in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 71(8), 516–520.