

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

KATHERINE AQUINO MATIAS

PERFIL DE MOLÉCULAS IMUNOLÓGICAS SOLÚVEIS PRESENTES NO  
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM NEUROPATOLOGIAS  
DE DIFERENTES ETIOLOGIAS

RECIFE  
2021

**KATHERINE AQUINO MATIAS**

**PERFIL DE MOLÉCULAS IMUNOLÓGICAS SOLÚVEIS NO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM NEUROPATOLOGIAS DE  
DIFERENTES ETIOLOGIAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em saúde, do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação  
Oswaldo Cruz, para obtenção do título de  
mestre em Biotecnologia e Biotecnologia em  
Saúde.

**Orientadora:**

**Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva**

**RECIFE**

**2021**

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

---

M433p Matias, Katherine Aquino.

Perfil de moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano de pacientes com neuropatologias de diferentes etiologias/ Katherine Aquino Matias– Recife: [s. n.], 2021.

88 p.: il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.

1. Neuropatologia. 2. Citocinas. 3. Biomarcadores. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

---

CDU 595.7

**KATHERINE AQUINO MATIAS**

**PERFIL DE MOLÉCULAS IMUNOLÓGICAS SOLÚVEIS PRESENTES NO  
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE PACIENTES COM NEUROPATOLOGIAS  
DE DIFERENTES ETIOLOGIAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do título de mestre em Biociências e Biotecnologia em Saúde.

Aprovado em: 21/6/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr<sup>a</sup>. Marli Tenório Correia

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Aos meus pais, Ana Lucia e Dejaide, que me ensinaram o valor da educação. A minha avo, Carmeluce, que sempre se orgulha de mim, mesmo quando eu não mereço. Ao meu avo Nilson, por sempre ter sido a minha inspirao.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família pelo constante apoio e sacrifícios.

Aos colegas de laboratório pelo apoio, companheirismo e ensinamentos Renata Almeida, Camila Rodrigues, Mauro César, Neila Caroline, Andreza Pamela, Jair Figueiredo, Paulin Sonon e Thaylane Gomes.

À minha orientadora pela contribuição e paciência, Norma Lucena Licínio Cavalcanti da Silva.

Aos colaboradores Elizabeth Lima Guimarães e Glauco Henrique Willcox por apoiar esse estudo e disponibilizar as instalações e equipamento do HLA Diagnóstico.

Aos colaboradores Flavia Falcão, Maria Lúcia Brito Ferreira, Eduardo Antônio Donadi, Flavia Tremeschin de Almeida Vieira e Isabelle Viana pelo apoio técnico essencial para a realização deste estudo.

Aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, afinal, o mérito nunca é próprio, é sempre comunitário.

MATIAS, Katherine Aquino. **Perfil de moléculas imunológicas solúveis presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com neuropatologias de diferentes etiologias**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## RESUMO

A Barreira Hematoencefálica (BBB) e o líquido cefalorraquidiano (LCR) são componentes do Sistema Nervoso Central (SNC), responsáveis pelo transporte seletivo de substâncias entre este e o sangue periférico. A neuroinflamação é caracterizada pela ativação contínua da micróglia e outras células da BBB. Identificar o perfil de moléculas solúveis no LCR pode auxiliar na investigação dos eventos neuroinflamatórios. Este estudo tem por objetivo avaliar o perfil de moléculas imunológicas solúveis presentes no LCR de pacientes com diferentes doenças neurológicas. Constituíram população de estudo 147 pacientes com dor de cabeça primária, esclerose múltipla (EM), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e infecções parasitárias, bacterianas e virais. A quantificação de sHLA-G foi realizada por ELISA e, das demais 35 moléculas, pelo imunoensaio LUMINEX®. Os dados foram analisados usando os *softwares* GraphPad Prism 5.0 e SPSS e aplicando testes paramétricos e não paramétricos considerando  $P < 0,05$ . Entre os pacientes recrutados, 56% eram mulheres e a média de idade foi de 40 anos. O aumento da celularidade no LCR foi observado na EM e na doença infecciosa, enquanto que o aumento dos níveis de proteína foi encontrado apenas na doença infecciosa. As enxaquecas apresentaram aumento de sHLA-G proporcional a gravidade da doença, além de aumento dos níveis de IL-8, MIG, IP-10 e IL-9 na forma mais grave da doença, sugerindo correlações recíprocas das moléculas imunes para controle da inflamação. Em EM foi marcante a presença de moléculas inflamatórias ligadas a migração de células T, enquanto que na ELA houve uma redução dessas mesmas moléculas. Em ambas, observou-se uma diminuição da molécula MCP-1, associada a gravidade da doença. Nas infecções bacterianas e parasitárias, as quimiocinas pareceram exercer um papel central na resposta imune no SNC. Na infecção viral observou-se uma resposta padrão independentemente do agente viral, apesar do destaque de IP-10 e MCP-1 na infecção por arbovirus.

Palavras-chave: Neuroinflamação. Citocinas. Biomarcadores. Neuroimunidade.

MATIAS, Katherine Aquino. **Profile of soluble immunologic molecules present in the cerebrospinal fluid of patients with neuropathologies of different etiologies.** 2021. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

## **ABSTRACT**

The Blood Brain Barrier (BBB) and the cerebrospinal fluid (CSF) are components of the Central Nervous System (CNS), responsible for the selective transport of substances between the CNS and the peripheral blood. Neuroinflammation is characterized by continuous activation of microglia and other cells in the BBB. Identifying the profile of soluble molecules in the CSF can help in the investigation of neuroinflammatory events. This study aims to evaluate the profile of soluble immune molecules present in the CSF of patients with different neurological diseases. The study population consisted of 147 patients with primary headache, multiple sclerosis (MS), amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and parasitic, bacterial and viral infections. The quantification of sHLA-G was performed by ELISA and, of the other 35 molecules, by the LUMINEX® immunoassay. Data were analyzed using GraphPad Prism 5.0 and SPSS software and applying parametric and non-parametric tests considering  $P < 0.05$ . Among the recruited patients, 56% were women and the mean age was 40 years. Increased CSF cellularity was observed in MS and infectious disease, whereas increased protein levels were found only in infectious disease. Migraines showed an increase in sHLA-G proportional to the severity of the disease, in addition to increased levels of IL-8, MIG, IP-10 and IL-9 in the most severe form of the disease, suggesting reciprocal correlations of immune molecules for controlling inflammation. In MS, the presence of inflammatory molecules linked to T cell migration was marked, while in ALS there was a reduction of these same molecules. In both, a decrease in the MCP-1 molecule was observed, associated with the severity of the disease. In bacterial and parasitic infections, chemokines seem to play a central role in the immune response in the CNS. In viral infection, a standard response was observed regardless of the viral agent, although IP-10 and MCP-1 stood out in arbovirus infection.

Keywords: Neuroinflammation. Cytokines. Biomarkers. Neuroimmunity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diagrama da Barreira hematoencefálica e outros componentes do cérebro .....	15
Figura 2 - Desenho esquemático da circulação do líquido cefalorraquidiano .....	18
Figura 3 - Desenho esquemático da sequência de ações para a coleta de dados e amostras.....	33
Gráfico 1 - Perfil de participantes do estudo de acordo com o gênero.....	39
Gráfico 2 - Perfil da população de estudo de acordo com a idade e neuropatologia apresentada. ....	40
Gráfico 3 - Características celular e proteica gráficos do líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias. ....	42
Gráfico 4 - Perfil da concentração de HLA-G solúvel em ng/mL no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes patologias.....	43
Gráfico 5 - Concentração das moléculas imunológicas solúveis em pg/mL presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias .....	46
Figura 4 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis .....	48
Figura 5 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis .....	49
Figura 6 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de pacientes em relação as informações adquiridas do LCR.....	35
Tabela 2 - Valores de celularidade e concentração de cloreto, glicose e proteínas presente no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias. ....	41
Tabela 3 - Presença de moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano de acordo com a neuropatologia apresentada. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido Aracnóico
BBB	Barreira Hematoencefálica
CCL	Ligante de quimiocina do motivo C-C
CEI	Síndromes Clinicamente Isoladas
COX	Ciclooxigenase
CXCL	Ligante de quimiocina do motivo C-X-C
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EM	Esclerose Múltipla
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblasto
G-CSF	Fator Estimulador de Colônia
GM-CSF	Fator Estimulado de Colônia de Granulócitos-macrófagos
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP	Proteína Induzida por Interferon- $\gamma$
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LIS	Líquido Intersticial
MAP	Proteino-quinases Ativadas por Mitógenos
MCP	Proteína Quimiotrante de Monócitos
MIG	Monocina Induzida por Interferon- $\gamma$
MIP	Proteína Inflamatória de Macrófagos
MMPs	Metaloproteinasas da Matriz
NF $\kappa$ B	Fator Nuclear Kapa B
NK	Células assassinas Naturais
NLR	NOD-Like
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
RANTES	Regulado após ativação de célula T normal Expressa e Secretada

SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TJ	Junções Estreitas
TLR	Toll-Like
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UNV	Unidade Neurovascular
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial
Viral A	Infecção Viral Arbovirose
Viral NA	Infecção Viral Não-Arbovirose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Barreira Hematoencefálica</b> .....	14
<b>1.1.1 Estrutura da Barreira Hematoencefálica e Suas Funções</b> .....	14
<b>1.1.2 Líquido Cefalorraquidiano</b> .....	16
<b>1.1.3 Inflamação e a Barreira Hematoencefálica</b> .....	18
1.1.3.1 Modificações da Barreira Hematoencefálica na Inflamação Sistêmica .....	19
1.1.3.2 Modificações da Barreira Hematoencefálica na Neuroinflamação .....	21
<b>1.2 Doenças Neurológicas de Origem Infecciosa</b> .....	22
<b>1.2.1 Infecção de Origem Viral</b> .....	22
1.2.1.1 Infecção por Vírus da Família Flaviviridae .....	23
1.2.1.2 Infecção por Vírus da Família Togaviridae .....	24
1.2.1.3 Infecção por Vírus da Herpes simplex .....	24
<b>1.2.2 Infecção de Origem Bacteriana</b> .....	25
1.2.2.1 Meningite Bacteriana .....	26
<b>1.3 Doenças Neurológicas Autoimunes</b> .....	27
<b>1.3.1 Esclerose Múltipla</b> .....	27
<b>1.4 Biomarcadores para Neuropatologias</b> .....	29
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	31
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	31
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>3.1 Área e População de Estudo</b> .....	32
<b>3.2 Coleta de dados</b> .....	32
<b>3.3 Determinação dos níveis de HLA-G solúvel no LCR</b> .....	35
<b>3.4 Determinação dos níveis de moléculas solúveis no LCR</b> .....	36
<b>3.5 Análise dos dados</b> .....	37
<b>4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	38
<b>5 RESULTADOS</b> .....	39
<b>5.1 Perfil Epidemiológico dos pacientes</b> .....	39
<b>5.2 Perfil celular e bioquímico do líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias</b> .....	40
<b>5.3 Perfil da molécula imunorregulatória HLA-G solúvel no líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias</b> .....	42

<b>5.4 Perfil das demais moléculas solúveis no líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias .....</b>	<b>43</b>
<b>5.5 Correlações entre moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano .....</b>	<b>47</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICE B – TABELA DAS CONCENTRAÇÕES DE MOLÉCULAS SOLÚVEIS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E SUAS SIGNIFICÂNCIAS ESTATÍSTICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICE C – ARTIGO .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A neuroinflamação no sistema nervoso central (SNC) é um importante objeto de estudo da pesquisa neuroimunológica e um elemento-chave em vários distúrbios neurológicos, incluindo doenças neurodegenerativas e lesão do SNC. A neuroinflamação é um processo complexo que envolve em uma organização dinâmica vários grupos de células no SNC e células imunológicas periféricas (YANG et al., 2018). A forma como as células estão organizadas no SNC e suas interações entre si serão descritas a seguir.

### 1.1 Barreira Hematoencefálica

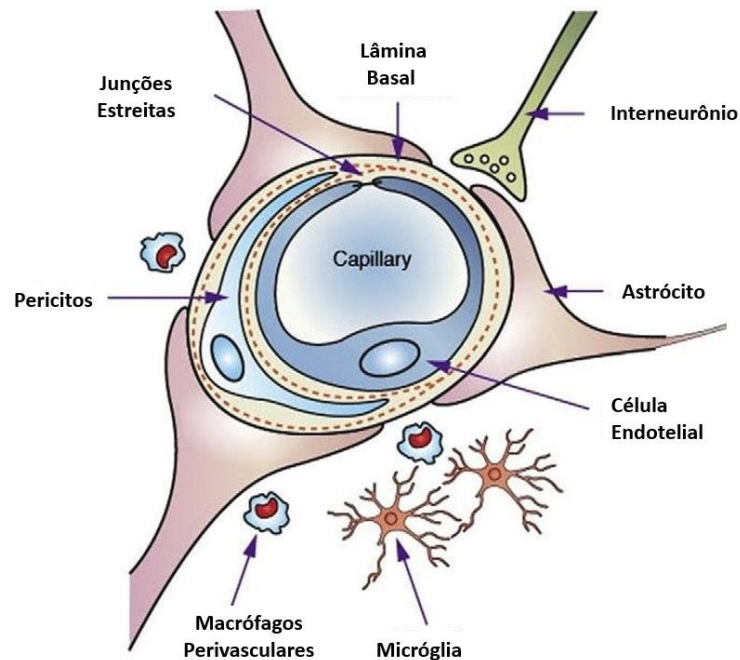
A Barreira Hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood Brain Barrier*) é um componente do Sistema Nervoso Central (SNC), responsável pelo transporte seletivo de substâncias através do fluido extracelular no SNC e no sangue periférico (SHARMA et al., 2018).

#### 1.1.1 Estrutura da Barreira Hematoencefálica e Suas Funções

Anatomicamente, a BBB é composta por uma complexa estrutura de microvasos firmemente ligados uns aos outros formando uma barreira praticamente impermeável, separando o cérebro e o sangue circulante. Mas são nos níveis histológico e molecular que sua função e estrutura é melhor compreendida (SHARMA et al., 2018).

Histologicamente, a BBB é um conjunto de várias camadas sobrepostas compostas de células endoteliais não fenestradas ligadas com junções estreitas (TJ, do inglês *tight junctions*) com atividade vesicular reduzida, pericitos que cobrem a superfície externa do endotélio, duas membranas basais (membrana basal vascular e *glia limitans*) e astrócitos. No espaço entre vênulas, vasos circundantes, células epiteliais e tecido cerebral, há macrófagos perivasculares e micróglia que são responsáveis pela imunidade do SNC (Figura 1) (VARATHARAJ; GALEA, 2017).

Figura 1 - Diagrama da Barreira hematoencefálica e outros componentes do cérebro



Fonte: Parashar e Nema (2012).

Nota: Na imagem estão evidentes o interior do capilar envolto por célula endotelial ligada por junções estreitas; o pericito envolto pela lâmina basal ancorando as células endoteliais; extensões dos astrócitos ligadas a lâmina basal; e macrófagos e microglia livres nas regiões circundantes.

Por sua vez, em nível molecular, há diversas ectoenzimas, receptores e transportadores nas camadas da BBB responsáveis por regular a concentração de moléculas no líquido cefalorraquidiano e a direção do transporte através da barreira. As enzimas também são importantes para o metabolismo de substratos endógenos, como ácidos graxos, hormônios, esteroides e vitaminas, e fazem parte da regulação da concentração de moléculas de vias sinalizadoras. Por exemplo, as células endoteliais da BBB também expressam sistemas responsáveis pelo metabolismo de drogas encontrados normalmente no fígado, tais como P450 e enzimas do metabolismo fase II. Essas enzimas contribuem com os transportadores de efluxo, cumprindo uma função de desintoxicação da barreira (DISDIER; STONESTREET, 2019; VARATHARAJ; GALEA, 2017).

O pequeno espaço paracelular entre as células endoteliais, resultado da estreita e forte ligação entre as células adjacentes, é a principal barreira física da BBB. Esta ligação se dá através de junções proteicas conectadas às proteínas citoesqueléticas de actina formando uma membrana continua com resistência elétrica muito alta, cerca de 2000U/cm<sup>2</sup>. Os pericitos vasculares cercam o endotélio e estão embebidos na membrana basolaminal que compartilham com as células da parede do



vaso. Esses pericitos fornecem suporte estrutural e metabólico para a barreira endotelial e para o desenvolvimento da lâmina basal. A lâmina basal é constituída por vários tipos de laminina, colágeno, glicoproteínas e proteoglicanos, promovendo o ancoramento das células endoteliais. Várias extensões astrocíticas formam a *glia limitans* e envolvem os capilares, induzindo características de barreira às células endoteliais do cérebro. Os astrócitos também fornecem uma ligação celular para neurônios e expressam muitos transportadores que participam da regulação da homeostase cerebral. Junto a micróglia, presente na área perivascular, essa estrutura multicelular facilita a comunicação próxima entre os neurônios parenquimatosos e o endotélio, sendo chamada de unidade neurovascular (UNV) (DISDIER; STONESTREET, 2019; SHARMA et al., 2018).

Uma importante função da BBB é manter diferenças na concentração de muitos eletrólitos entre o sangue e o cérebro, evitando grandes flutuações no cérebro dos níveis de moléculas relacionadas a ingestão de alimentos, exercícios, etc. É nesse contexto que a UNV promove a estabilidade do ambiente do SNC, mantendo uma composição iônica diferente, necessária para a função neuronal; uma variedade de neurotransmissores especializados; uma baixa concentração de proteínas, para minimizar a proliferação celular; uma baixa exposição às toxinas sistêmicas, para minimizar os danos neuronais; e o tráfego de células e moléculas inflamatórias reduzido, minimizando a inflamação local (DISDIER; STONESTREET, 2019; ROSENBERG, 2017; VARATHARAJ; GALEA, 2017).

### **1.1.2 Líquido Cefalorraquidiano**

Além da barreira física promovida pelas células endoteliais e pericitos, e a barreira molecular promovida por enzimas e moléculas transportadoras, há ainda outras camadas protetoras do cérebro. O líquido cefalorraquidiano (LCR) e líquido intersticial (LIS) se unem e formam uma interface com o sangue no plexo coroide. Isso ocorre porque as células das vilosidades aracnoides no espaço subaracnoide, responsáveis por transferir LCR/LIS para o sangue também formam uma barreira que impede que componentes do sangue entrem no SNC (ROSENBERG, 2017).

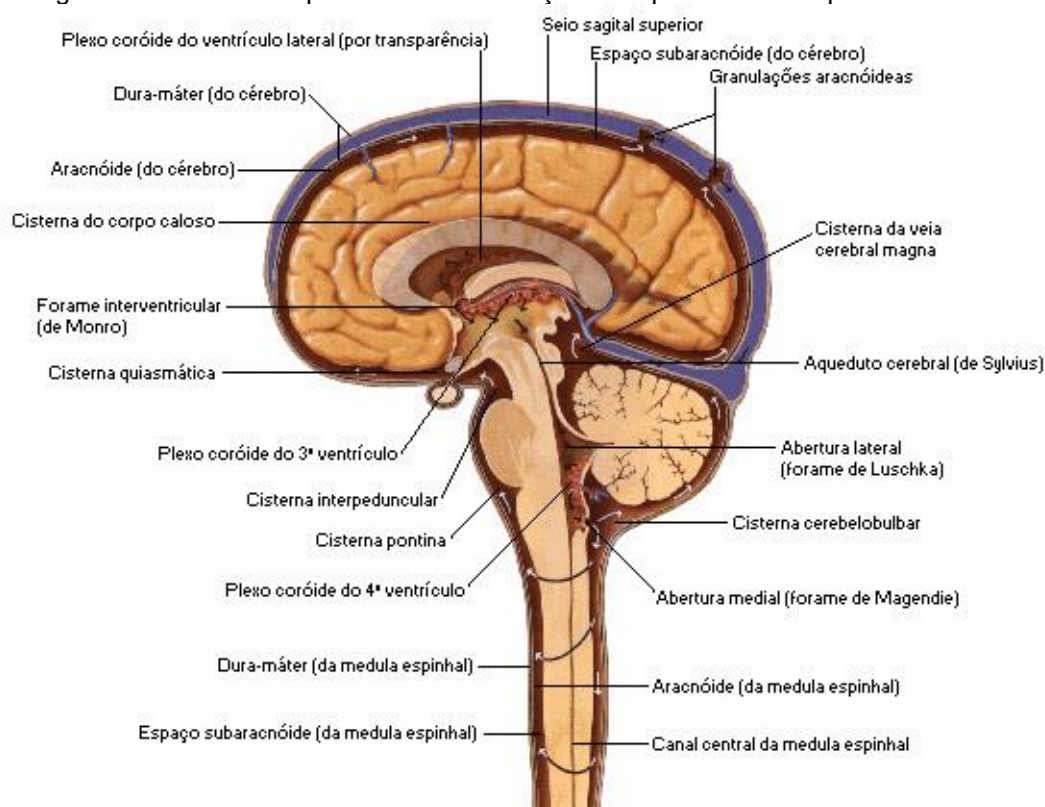
O LCR é produzido pelas células epiteliais que revestem a superfície apical dos plexos coroides, estes flutuam livremente no ventrículo lateral e no quarto ventrículo. As bombas de sódio-potássio dependentes de ATPase, que ocorrem na superfície

externa das células epiteliais, provocam um desequilíbrio iônico que gera energia para a secreção de LCR (ROSENBERG, 2017). A taxa produção de LCR é cerca de 0,3 mL/min ou 500mL/dia, resultando na circulação do LCR várias vezes durante o dia (CSERR, 1971).

A produção de líquido intersticial também contribui para o LCR, estima-se que o LIS contribua com cerca de 60% do LCR em primatas não humanos (MILHORAT et al., 1971). O LIS também é gerado através de uma bomba de ATPase, porém localizada na superfície abluminal do capilar das células endoteliais cerebrais. O LIS move-se através do espaço extracelular e ao longo das vias perivasculares, encontrando o LCR nos ventrículos e, por fim, é drenado nos linfonodos cervicais, onde pode ocorrer a entrada de antígenos cerebrais na circulação sistêmica (ROSENBERG, 2017). Astrócitos e capilares, com envolvimento de aquaporinas, são responsáveis pelo movimento do LIS (MESTRE et al., 2018).

Quando o líquido intersticial se une ao LCR nos ventrículos, é iniciada a circulação do LCR. Este sai através do forame intraventricular para o terceiro ventrículo e depois, através do aqueduto cerebral, para o quarto ventrículo. Em seguida segue para a cisterna magna através dos forames de Luschka e Magendie, e então para o espaço subaracnoide (Figura 2). Após sair do sistema ventricular o líquido cefalorraquidiano segue para as cisternas subaracnoides na base do cérebro, onde parte do LCR segue para mover-se sobre as convexidades cerebrais, e a outra flui para o espaço subaracnoide da coluna vertebral até a segunda vértebra sacral, na região conhecida como saco lombar (WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012).

Figura 2 - Desenho esquemático da circulação do líquido cefalorraquidiano



Fonte: Netter (2000).

Nota: Circulação do líquido cefalorraquidiano, desde de sua saída do forame intraventricular para o terceiro ventrículo até chegar as granulações aracnoideas onde o líquido cefalorraquidiano é drenado para o sangue.

O LCR é drenado principalmente pelo tecido de granulação aracnoide. As vilosidades aracnoideas apresentam uma série de canais que se comportam como válvulas unidirecionais, permitindo que o LCR seja drenado para o sangue, mas impedindo que o sangue entre no LCR. Essa absorção é movida por um gradiente de pressão, quanto maior a resistência à saída do LCR maior é a pressão do LCR. Infecções e alteração de moléculas e células imunológicas podem impedir a saída do LCR para o sangue aumentando a pressão (ROSENBERG, 2017; WRIGHT; LAI; SINCLAIR, 2012).

### 1.1.3 Inflamação e a Barreira Hematoencefálica

A barreira hematoencefálica é influenciada por mediadores inflamatórios sistêmicos e locais, desempenhando um importante papel na resposta imune do SNC. A ativação de vias inflamatórias pode provocar mudanças na barreira que alteram sua seletividade, permitindo a passagem de moléculas e células que não pertencem ao

ambiente do SNC ou aumentando a concentração de moléculas nativas do SNC. Essas mudanças podem ser classificadas em mudanças disruptivas e não-disruptivas (ROSENBERG, 2017; SHARMA et al., 2018; VARATHARAJ; GALEA, 2017).

As mudanças disruptivas são aquelas que provocam mudanças físicas na anatomia da barreira, tais quais, danos nas células endoteliais, afrouxamento das junções intercelulares (TJ), o colapso da *glia limitans*, entre outras. Essas mudanças permitem o tráfego de células e substâncias pela BBB sem qualquer seletividade. Por sua vez, as mudanças não-disruptivas correspondem a mudanças moleculares, ou seja, que alteram a fisiologia da BBB mas não provocam alterações físicas. Essas alterações em mediadores inflamatórios e moléculas transportadoras são direcionadas a substâncias específicas em oposição a generalidade de moléculas e células que podem trafegar pela barreira nas mudanças disruptivas (SHARMA et al., 2018; VARATHARAJ; GALEA, 2017).

Além disso, a própria BBB desempenha função ativa na modulação da neuroinflamação, graças as suas funções de produção e transporte de mediadores inflamatórios, bem como a expressão de moléculas de adesão. Tanto micróglia como astrócitos são ativados pela cascata inflamatória e atuam na propagação da inflamação pela barreira e pelo parênquima cerebral. A inflamação pode ser provocada por uma infecção, por uma injúria mecânica ou ainda por uma reação autoimune, iniciada no SNC ou em qualquer outro órgão. A ativação de uma única via inflamatória, tanto local quanto sistêmica, pode causar mudanças disruptivas, ou não-disruptivas, ou ainda ambas simultaneamente (DISDIER; STONESTREET, 2019).

### *1.1.3.1 Modificações da Barreira Hematoencefálica na Inflamação Sistêmica*

A inflamação sistêmica pode ser causada por injúria mecânica, como pancadas ou quedas, por atividade autoimune, de hipersensibilidade, ou ainda por infecções, que podem ser de origem parasitária, fúngica bacteriana ou viral. Durante uma inflamação sistêmica, diversas vias imunológicas são ativadas, porém três parecem ter maior destaque no dano a BBB: a via da cicloxigenase (COX), a via das Proteínocinasas ativadas por mitógenos (MAP quinases) e a do Fator Nuclear Kapa B (NFkB) (HAN et al., 2016).

As ciclooxigenases metabolizam o ácido araquidônico (AA) que dá origem a variadas moléculas coletivamente conhecidas como prostanóides. Essas moléculas

se ligam a receptores amplamente expressos no sistema imune, incluindo células T, células B, células dendríticas e macrófagos, e desempenham um papel importante na modulação da resposta inflamatória (LI et al., 2013). Nas alterações na BBB, os prostanoídes e as espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico (NO) têm um importante papel no dano as TJ, causando o afrouxamento das junções. Essas moléculas também podem causar dano mitocondrial e levar as células endoteliais da barreira a apoptose (DOLL et al., 2015; QIN et al., 2015).

As MAP quinases são proteínas responsáveis por regular atividades celulares como expressão gênica, mitose, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose. Essa via é ativada por estímulos extracelulares como citocinas e quimiocinas circulantes que se ligam a receptores celulares. Na BBB, as MAP quinase provocam a apoptose das células endoteliais e ativam proteínas que causam o afrouxamento das TJ (CARDOSO et al., 2012; KARAHASHI; MICHELSEN; ARDITI, 2009).

Por sua vez, o NFκB desempenha um papel no nível da transcrição gênica iniciando uma cascata imunológica e induzindo a produção de diversas citocinas que ativam a expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) nas células endoteliais e neutrófilos. Essas proteínas contribuem para a degradação de componentes da matriz extracelular e de componentes das TJ, causando o afastamento das células endoteliais e alterando a integridade da barreira. As MMPs também estão relacionadas a degradação de componentes e o colapso da glia limitans, última camada física da BBB, permitindo que leucócitos invadam o ambiente do SNC (CARDOSO; BRITES; BRITO, 2010; HAN et al., 2016; PIEPER; PIELOCH; GALLA, 2013; QIN et al., 2015).

Mesmo que não haja nenhum dano disruptivo e as células endoteliais e as junções estreitas permaneçam intactas, é possível haver danos não-disruptivo durante uma inflamação sistêmica através de outras vias. Transportadores para ânions orgânicos, monocarboxilatos, aminoácidos, b-amilóide, leptina e prostaglandina E2 são desregulados durante a inflamação sistêmica (AKANUMA et al., 2011; WITTMANN et al., 2015). Há também evidências de regulação positiva induzida por inflamação de transportadores de influxo responsáveis por fator de necrose tumoral-α (TNF-α), insulina, monoaminas, enzimas lisossômicas, β-amilóide, fator inibidor da leucemia e a proteína viral gp120 (URAYAMA et al., 2015; WU et al., 2015).

As citocinas também estão diretamente envolvidas em algumas alterações não-disruptivas da BBB. Os receptores para TNF-α, interleucina-1β (IL-1β) ou interleucina 6 (IL-6) são expressos no endotélio cerebral. O IL-1β e TNF-α circulantes podem

estimular células endoteliais do cérebro a produzir citocinas pró-inflamatórias (SKELLY et al., 2013). Por sua vez, o interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) reduz a transmigração de linfócitos Th1 pela ação de citocinas que induzem mudanças não-disruptivas na BBB sem nenhuma mudança nas TJ, diminuindo a inflamação (VARATHARAJ; GALEA, 2017).

### 1.1.3.2 Modificações da Barreira Hematoencefálica na Neuroinflamação

A neuroinflamação é o mecanismo de inflamação do sistema nervoso central em resposta ao trauma, infecção ou a doenças neurodegenerativas. É caracterizada pela ativação contínua da micróglia e outras células da BBB, e influxo de outros mediadores e células imunes. Diversos componentes da UNV são ativados durante a neuroinflamação, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas pelas células endoteliais do cérebro e a estimulação microglial. Quando de curta duração é considerada neuroprotetora, mas quando crônica é bastante danosa para SNC. Dois processos principais são encontrados na maioria das doenças neurais, tais quais: alteração nos vasos sanguíneos e escape de células imunes do sangue circulante para o SNC (SHABAB et al., 2016).

Alterações nos vasos sanguíneos levam a vasodilatação e ao aumento do fluxo sanguíneo aumentando a permeabilidade vascular e induzindo o vazamento de proteínas plasmáticas. Em respostas a estímulos externos (microrganismos) ou internos (autoimunidade), tanto a micróglia quanto astrócitos são “ativados” através dos receptores *Toll-Like* (TLR) e dos receptores *NOD-Like* (NLR) e começam a produzir TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, além de quimiocinas e INF- $\gamma$ . TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, induzem a expressão de moléculas de adesão endotelial, incluindo selectinas, VCAM-1, e ICAM-1, permitindo que células imunes se infiltrem na BBB. Citocinas pró-inflamatórias também estimulam a expressão de MMPs, que degradam componentes da matriz extracelular na membrana basal e nas junções estreitas. Esses eventos resultam em danos na estrutura da barreira, facilitando ainda mais a infiltração de células imunes e agravando a neuroinflamação (SHARMA et al., 2018; SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013).

Estudos demonstram que o TNF- $\alpha$  aumenta a permeabilidade da BBB por modulação das proteínas TJ e a expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais do cérebro, promovendo a adesão e a migração de leucócitos e agravando

as alterações na BBB. Esta citocina também aumenta a capacidade fagocítica da micróglia (SHASTRI; BONIFATI; KISHORE, 2013). Experimentos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a exposição à IL-1 $\beta$  aumenta a permeabilidade da BBB reduzindo a proteína TJ e ocludina por proteólise, resultando em uma lesão na barreira. A IL-1 $\beta$  também induz o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IL-6 colaborando para a cronicidade da inflamação. Estudos com a proteína IL6 também mostram uma diminuição da expressão das proteínas TJ, ocludina e claudina-5. Outras características, como apoptose endotelial e dano mitocondrial, também estão implicadas na perda da integridade da BBB durante a neuroinflamação (ROSENBERG, 2017).

## **1.2 Doenças Neurológicas de Origem Infecciosa**

Infecção por microrganismos no SNC é uma ocorrência importante e relativamente comum e são principalmente causadas por vírus e bactérias, apesar de fungos e protozoários também serem agentes causadores de neuroinfecções. As principais infecções virais do SNC são causadas por enterovírus, que causam a maioria dos casos de meningite asséptica e meningoencefalite; citomegalovírus humano; vírus do herpes simplex; vírus varicela-zoster e os vírus emergentes, tais quais o vírus do Nilo Ocidental, henipavírus, vírus da encefalite japonesa, vírus chikungunya, vírus Zika, vírus da Dengue, vírus Ebola e vírus da raiva. Existem também muitos patógenos bacterianos associados à invasão do SNC, sendo as principais apresentações clínicas a meningite, a meningoencefalite e as síndromes focais do SNC (DANDO et al., 2014).

### **1.2.1 Infecção de Origem Viral**

Neuropatias relacionadas a vírus neurotrópicos é caracterizada pela presença de partículas virais infecciosas, mediadoras inflamatórias e células imunológicas no ambiente do SNC, que se desenvolve em disfunção neuronal ou na destruição de tecidos parenquimatosos (KOYUNCU; HOGUE; ENQUIST, 2013).

Os vírus podem invadir o SNC através da BBB ou usando outras rotas. A infecção pode surgir em qualquer tecido e então se expandir para tecidos adjacentes e atingir terminações nervosas periféricas, migrando para a medula espinhal; ou o

vírus pode infectar neurônios olfativos adjacente à placa cribiforme; ou ainda infectar células epiteliais do plexo coroide. Por outro lado, as infecções virais que entram no SNC através da BBB seguem três rotas de invasão conhecidas: o modelo “cavalo de Troia”, que se caracteriza pelo transporte intracelular nas células mieloides infectadas; entrada pelo espaço paracelular devido a perda da integridade da BBB; e a infecção das células endoteliais com a disseminação do vírus para outros tecidos (DAHM et al., 2016; KOYUNCU; HOGUE; ENQUIST, 2013).

Os danos a barreira hematoencefálica podem decorrer de outros mecanismos além da infecção das células endoteliais. A produção local de citocinas no SNC decorrente da infecção viral também afeta as TJ. As quimiocinas recrutadoras como MCP-1 e CCL2, por exemplo, são induzidas por infecções virais e podem danificar as proteínas TJ e expor o SNC a danos decorrentes da resposta imune (KOYUNCU; HOGUE; ENQUIST, 2013). As citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, também são produzidas durante a inflamação sistêmica causada pelo vírus e, como visto anteriormente, alteram a permeabilidade da BBB. Nas infecções virais do SNC, os desfechos letais e os danos ao tecido cerebral podem não resultar da replicação viral, mas da resposta exacerbada que causa inflamação descontrolada (DANDO et al., 2014).

#### 1.2.1.1 Infecção por Vírus da Família *Flaviviridae*

Os vírus da família *Flaviviridae* são vírus de RNA de fita simples que infectam humanos e demais mamífero e são predominantemente transmitidos por artrópodes. Dentro dessa família os vírus da Dengue, da Zika, da encefalite japonesa e do Nilo Ocidental causam infecções graves no SNC de humanos (DAHM et al., 2016).

A Zika se manifesta clinicamente de maneira ampla, os pacientes geralmente apresentam febre leve a moderada, manchas avermelhadas na pele, cefaleia e artralgia. O tratamento é sintomático com reposição de líquidos e analgésicos, uma vez que não há tratamento específico. Como a maioria dos pacientes é assintomático e os sintomas comuns são considerados de leve a moderados, apesar de isolado desde 1947, o ZIKV se tornou um vírus de grande importância para a saúde pública após ser associado com anomalias congênitas do SNC (Síndrome congênita da ZIKA) e a Síndrome de Guillain-Barré durante epidemia de 2014 no Brasil (KAM et al., 2017).

Um estudo que analisou o soro de pacientes infectados com ZIKV identificou maiores níveis de IL-18, IL-6, IL-7, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , todas citocinas conhecidas pela



atividade pró-inflamatória. A IL-18 e o IFN- $\gamma$  são conhecidos por ativas células *Natural Killers* (NK) que podem causar lesões ao SNC. Por sua vez, IL-6 e TNF- $\alpha$  são conhecidos recrutadores de macrófagos e células T e apresentam um importante papel na manutenção da inflamação (KAM et al., 2017; MANSUY et al., 2019).

### 1.2.1.2 Infecção por Vírus da Família *Togaviridae*

A família *Togoviridae* é uma família de vírus de RNA encontrados em mosquitos, aves, humanos e demais mamíferos. Um do vírus de maior interesse dessa família é o vírus da Chikungunya, um vírus transmitido por artrópode presente na Ásia, África e América Latina, conhecido por causar artralgia permanente e artrite, além de manifestações neurológicas como encefalite e síndrome de Guillain-Barré (DAHM et al., 2016).

Estudos demonstram que várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como a CCL2, IL-6 e TNF- $\alpha$  são reguladas positivamente no cérebro de camundongos, atraindo células T e macrófagos para o SNC. Foi observado também altos níveis de IL-10 após a infecção pelo CHIKV, também em camundongos. A IL-10 pode ter ação imunossupressora e impedir a ação de células T e *Natural Killers* (NK), impedindo a contenção da infecção (DAGINAWALA et al., 2009).

### 1.2.1.3 Infecção por Vírus da *Herpes simplex*

O vírus *Herpes simplex* (HSV) 1 é o patógeno comum e invasivo, que acomete cerca de 70% dos humanos em todo o mundo, geralmente adquirido por contato íntimo com a família na primeira infância (WHITLEY, 2006). É um vírus neurotrópico que infecta

inicialmente as mucosas periféricas e permanece latente no sistema nervoso estabelecendo uma infecção latente para toda a vida (FELDMAN et al., 2002; SHIVKUMAR et al., 2013). A encefalite causada por *Herpes simplex* é a causa mais comum de encefalite fatal (PIRET; BOIVIN, 2020).

Um estudo aponta que IL-8, MIG e IP-10 estão presentes em níveis elevados no LCR de pacientes com encefalite causada por *Herpes simplex* quando comparados aos níveis encontrados no soro (LIND et al., 2017). Outro estudo observou que a

desmielinização se agrava em camundongos com encefalite causada por HSV e recebem IL-2 (MOTT et al., 2013).

### **1.2.2 Infecção de Origem Bacteriana**

As infecções bacterianas do SNC são condições que apresentam alta taxa de mortalidade é uma condição com risco de vida e com alta taxa de mortalidade e atingem principalmente as meninges e a medula espinhal. As infecções do SNC podem apresentar-se clinicamente como meningite, meningoencefalite e, mais raramente, mielite (BARICHELLO et al., 2013).

Mesmo com a presença de barreiras protetoras, as bactérias podem atingir o SNC. Bactérias que classicamente infectam a meninge podem entrar no LCR penetrando a BBB dos microvasos cerebrais e no líquido intersticial. As bactérias podem atravessar o BBB por penetração transcelular, onde, após a adesão bacteriana às células endoteliais ou epiteliais, as bactérias são translocadas através da barreira por pinocitose ou mecanismos mediados por receptores. Alternativamente, as bactérias podem invadir o SNC paracelularmente após a ruptura das TJ, resultando em aumento da permeabilidade. Outra forma de travessia é via leucócitos infectados da circulação periférica (mecanismo “Cavalo de Troia”), onde células imunes infectadas entram no SNC. Em uma outra rota, mais comum, a bactéria entra no LCR através do plexo coroide, que possui resistência elétrica mais baixa entre as células epiteliais (DANDO et al., 2014).

A reprodução das bactérias no SNC ocorre em associação com a liberação de compostos como o peptidoglicanos, fragmentos da parede celular, lipossacarídeos, ácido lipoteicóico e exotoxinas, que são altamente imunogênicas e podem contribuir para o aumento da inflamação. Essas substâncias, conhecidas como PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) são cada vez mais reconhecidas por desempenhar um papel central na morbidade e mortalidade nas doenças neurológicas (HUANG et al., 2019).

As PAMPs são reconhecidas por receptores como o TRL. A sua recepção pelos diversos TRLs ativa a transcrição de NFkB que inicia uma cascata imunológica induzindo a produção de citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL- 6 e TNF- $\alpha$ . Na meningite meningocócica, por exemplo, os níveis de TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  e IL- 6 estão associados a desfechos fatais da doença. Assim como nas infecções virais, nas infecções

bacterianas o dano causado ao SNC não está apenas ligado a presença do patógeno nesse ambiente, mas à resposta exacerbada do sistema imune ao invasor (BARICHELLO et al., 2013; HUANG et al., 2019).

#### 1.2.2.1 Meningite Bacteriana

As meningites bacterianas são as infecções mais graves e frequentes do SNC e estão associadas a uma alta taxa de mortalidade e a danos neurológicos graves. Os três principais patógenos causadores de meningite bacteriana são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* tipo B e *Neisseria meningitidis*, sendo as infecções causadas pela *Streptococcus pneumoniae* a que resulta em maior número de desfechos fatais ou lesões graves do SNC (GRANDGIRARD et al., 2013). Porém outras bactérias popularmente conhecidas por infectar outros órgãos também podem causar meningite como a *Treponema pallidum*, responsável pela infecção sexualmente transmissível sífilis, e a *Mycobacterium tuberculosis*, que causa a tuberculose (CHERIAN et al., 2021; MARRA, 2015).

A resposta inflamatória no SNC se inicia pelo reconhecimento dos patógenos invasores e resulta na produção local de mediadores solúveis. Células do SNC como, astrócitos, micróglia, células endoteliais, células ependimárias e macrófagos residentes, liberam citocinas inflamatórias de resposta precoce em reação a bactérias invasoras, como IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (GRANDGIRARD et al., 2013).

O TNF- $\alpha$  estimula o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção e ativa essas células para eliminar patógenos, liberando moléculas reativas de oxigênio e outros NO. Após estimulação por componentes da parede celular bacteriana ou TNF- $\alpha$ , a IL-1 é liberada por fagócitos mononucleares, células da glia e células endoteliais. O alto nível de IL-1 $\beta$  no LCR é correlacionado com o desfecho fatal e lesão grave nas meningites bacterianas. A IL-6 é produzida por monócitos, células endoteliais e astrócitos, principalmente em resposta à IL-1 $\beta$ . Outras citocinas e quimiocinas, tais quais IL-2, IL-8, IFN- $\gamma$ , MCP-1, MIP-1 e G-CSF, também foram encontrados em níveis elevados no LCR de pacientes com meningite bacteriana (DANDO et al., 2014; GRANDGIRARD et al., 2013).

Quando ocorre a invasão do SNC pelas células imunes periféricas MMPs e moléculas reativas de oxigênio são liberadas no LCR. Essas moléculas estão envolvidas na patogênese dos danos cerebrais. As MMPs estão envolvidas na ruptura

da barreira hematoencefálica, no extravasamento de células imunes, na liberação de citocinas e receptores de citocinas e no desenvolvimento de danos neuronais. Foi demonstrado que o óxido nítrico contribui para a fisiopatologia da meningite alterando a vascularização cerebral, causado por efeitos hiperêmicos na fase inicial e efeitos vasodilatadores que protegem contra isquemia na fase posterior (LEIB et al., 1998; LEIB, 2001).

### **1.3 Doenças Neurológicas Autoimunes**

As doenças autoimunes são caracterizadas pela perda da tolerância imunológica a autoantígenos, com produção de autoanticorpos e resposta imune exacerbada e crônica. Essas doenças podem afetar um ou vários órgãos. As doenças autoimunes neurológicas são aquelas que afetam especificamente o sistema nervoso central ou periférico. Embora essas doenças sejam bem categorizadas, algumas de suas manifestações são encontradas em condições não neurológicas, dificultando o esforço para diferenciá-las das doenças autoimunes sistêmicas. Entre as doenças autoimunes neurológicas mais comuns estão a esclerose múltipla, a síndrome de Guillain-Barré, miastenia gravis e neuromielite óptica (IORIO; O'TOOLE; PITTOCK, 2015; TOBIN; PITTOCK, 2017).

#### **1.3.1 Esclerose Múltipla**

A esclerose múltipla (EM) é a doença autoimune neurológica mais comum, com uma prevalência de 30,1 casos por 100.000 pessoas em todo o mundo e afeta principalmente adultos jovens entre 20 e 40 anos. A EM é caracterizada por ser crônica e atingir proteínas mielínicas e neuronais, induzindo assim a desmielinização dos axônios neuronais, morte celular e gliose astrocítica. Pacientes com esclerose múltipla podem desenvolver diferentes graus de distúrbios neurológicos que levam à incapacidade crônica devido a danos sensoriais, motores, autonômicos, visuais e cognitivos. A etiologia da EM não é clara, mas se supõe que tanto fatores genéticos complexos quanto fatores ambientais contribuam para a manifestação da doença (ACOSTA-AMPUDIA; MONSALVE; RAMÍREZ-SANTANA, 2019).

A EM se apresenta clinicamente em quatro formas: remitente-recorrente, secundária progressiva, progressiva primária e EM progressiva-recorrente. Pacientes

com um único surto de doença, mas ainda não diagnosticados com EM, são referidos como síndromes clinicamente isoladas (CEI), que é considerada a primeira manifestação da doença. Os gatilhos para a transição da forma clínica RR mais inflamatória e responsiva ao tratamento para a forma SP mais neurodegenerativa e resistente ao tratamento são desconhecidos (GALETTA; BHATTACHARYYA, 2019).

As células T CD4<sup>+</sup> são essenciais para a progressão da EM através da liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células Th1 e Th17 que induzem a infiltração de células imunes no SNC, iniciando uma reação autoimune a mielina. As células T citotóxicas contribuem para a EM ao reconhecer os peptídeos apresentados pelo MHC-I na superfície dos axônios neuronais, o que leva à morte das células da glia (JOHNSON et al., 2007). As células fagocíticas e macrófagos aumentam a resposta pró-inflamatória das células T e B, causando danos aos tecidos (ACOSTA-AMPUDIA; MONSALVE; RAMÍREZ-SANTANA, 2019).

Após a ativação, as células T virgens se diferenciam em várias populações de células T com diferentes funções efetoras. Como as células Th1 produzem citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- $\gamma$ , que ativa macrófagos; ou as células Th2 que secretam citocinas anti-inflamatórias como a IL-4 e são importantes na remoção de patógenos extracelulares. Uma desregulação no equilíbrio entre as citocinas Th1 e Th2 tem sido implicada na imunopatogênese da EM (ACOSTA-AMPUDIA; MONSALVE; RAMÍREZ-SANTANA, 2019).

As células Th17 representam uma linhagem distinta de células T efetoras. A IL-23 produzida por macrófagos e células dendríticas é crítica para a expansão das células Th17 que sintetizam as citocinas pró-inflamatórias IL-17A e IL-17F. Estudos em pacientes com EM e no modelos animais de encefalite demonstraram que as células que expressam IL-17 ou IFN- $\gamma$  cruzam eficientemente o BBB e se acumulam no cérebro e uma concentração aumentada de IL-17 foi encontrada no sangue, LCR e tecido cerebral de pacientes com EM (TZARTOS et al., 2008).

As células B também têm um papel importante na patogênese da EM. A presença de imunoglobulinas no LCR é um dos critérios de diagnóstico e estudos encontraram células B em lesões cerebrais e LCR de pacientes com EM além de evidências que demonstram que as células B podem participar diretamente do processo de desmielinização secretando anticorpos patogênicos que visam oligodendrócitos com ou sem a presença de complemento. Outra evidência é a terapia inibidora de células B com rituximab, um anticorpo monoclonal anti-CD20 que esgota

células B virgens e de memória, reduz lesões cerebrais inflamatórias da EM e recaídas clínicas (O'CONNOR et al., 2008).

#### 1.4 Biomarcadores para Neuropatologias

Atualmente diversos métodos de investigação podem identificar neuroinflamação, contudo eles são pouco sensíveis e precisos. Algumas das técnicas disponíveis como a ressonância magnética pode identificar inflamação e desmielinização em algumas doenças, mas na encefalite autoimune, por exemplo, os resultados frequentemente se apresentam não alterados (KOTHUR et al., 2016). Alguns marcadores do LCR, como pleocitose e bandas oligoclonais são pouco sensíveis e específicas. Mesmo a identificação de anticorpos de superfície de células neuronais identifica apenas um pequeno grupo de desordens neuroinflamatórias (HACOHEN et al., 2014; LANCASTER; DALMAU, 2012).

Devido a essas limitações, a identificação de outros biomarcadores se faz necessária e as citocinas e quimiocinas são fortes candidatas. As citocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular responsáveis pela comunicação intercelular e por regular a cascata inflamatória e o recrutamento de células imunes durante a inflamação (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). As quimiocinas são uma família de proteínas pequenas (8-14 kDa) que têm, junto aos seus receptores, um importante papel na inflamação recrutando leucócitos e outros tipos celulares (ZLOTNIK; YOSHIE, 2012).

As citocinas e quimiocinas envolvidas na imunidade mediada pelas células Th1 são encontradas em níveis elevados nas infecções virais, são elas principalmente o INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IP-10 e MIG. Outras citocinas como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 também são encontradas em níveis elevados nas neuroinfecções virais, como as encefalites virais. Entretanto, esse perfil também varia de acordo com o vírus que causou a encefalite. Por exemplo, nas encefalites causadas por *Herpes simplex*, o INF- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  são as moléculas mais elevadas no LCR, por sua vez, nas encefalites provocadas por enterovírus a IL-1 $\beta$  é a molécula com níveis mais elevados no LCR (KOTHUR et al., 2016).

Nas neuroinflamações crônicas desmielinizantes de origem autoimune, como a Esclerose Múltipla, o perfil de citocinas e quimiocina não é apenas uma ferramenta de diagnóstico, mas também uma forma de avaliar o prognóstico dos pacientes. Níveis

elevados de CXCL10 associados a baixos níveis de CCL2 indicam atividade mediada por INF- $\gamma$ , conhecido por desempenhar um importante papel na inflamação da esclerose múltipla o que o torna o principal alvo terapêutico no tratamento dessa desordem. Os baixos níveis de CCL2 também são associados aos episódios agudos recorrentes e as lesões no SNC (MATSUSHITA et al., 2013). As citocinas da família TH17, como a IL-17, IL-6 e IL-23, importantes na regulação da autoimunidade, foram encontradas em níveis elevados em pacientes com esclerose múltipla, porém seu envolvimento no desenvolvimento do quadro clínico dos pacientes ainda não é claro (WEN et al., 2012).

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o perfil e as diferenças nos níveis de moléculas imunológicas solúveis presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com neuropatologias de diferentes etiologias.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- a) Descrever as características bioquímicas e de celularidade do líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes doenças neurológicas;
- b) Caracterizar o perfil de moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes doenças neurológicas;
- c) Identificar diferenças nos níveis de moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano de pacientes de acordo com a doença neurológica.



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo é do tipo analítico observacional transversal com comparação de grupos, onde os pacientes com suspeita de doença neurológica foram selecionados aleatoriamente e posteriormente separados em grupos de acordo com o diagnóstico.

#### **3.1 Área e População de Estudo**

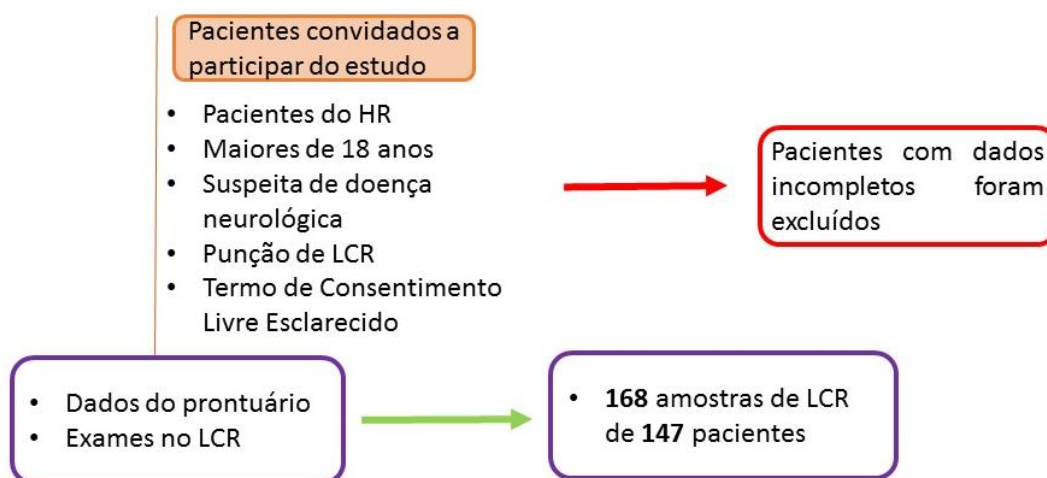
Constituíram população de estudo todos os pacientes que, no período de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, foram atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração. Os critérios de inclusão incluíram: (1) pacientes com diagnóstico de doença neurológica; (2) ter no mínimo 18 anos completos durante a execução do estudo.

Foram critérios de exclusão: (1) Preenchimento incompleto das informações referentes a identificação do paciente, dados clínicos ou de exames complementares; (2) Descontinuação do acompanhamento ambulatorial; (3) Óbito anterior à realização dos exames complementares; e (4) não ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, (5) e não ter coletado amostra biológica para estudo.

#### **3.2 Coleta de dados**

Os pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão e de exclusão, foram convidados a participar do estudo, após a explicação de seus objetivos, de seus direitos e da obrigatoriedade do pesquisador em obedecer aos requisitos éticos constantes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Para os pacientes que concordaram em participar, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (APÊNDICE A), a autorização para coleta de informação do seu prontuário, e a utilização de amostra de líquido cefalorraquidiano armazenada no serviço. Aqueles com dados incompletos foram excluídos gerando um grupo final de 168 (cento e sessenta e oito) amostras de LCR de 147 (cento e quarenta e sete) pacientes, como demonstra a figura 3.

Figura 3 - Desenho esquemático da sequência de ações para a coleta de dados e amostras.



Fonte: o autor, 2021.

Nota: Foram convidados a participar pacientes do Hospital da Restauração, maiores de 18 anos, que fizeram punção do LCR e assinaram o TCLE. Os dados do prontuário e LCR foram coletados. Aqueles pacientes com dados incompletos foram excluídos gerando um grupo de estudo final de 168 mostras de LCR de 147 pacientes.

As informações relativas à identificação do paciente e variáveis de estudo foram obtidas do prontuário hospitalar do paciente. Os pacientes foram então agrupados de acordo com o diagnóstico inicial, formando os seguintes grupos e subgrupos:

- a) Dor de cabeça primária - Quando não há estreita relação temporal com outro transtorno conhecido por causar cefaleia (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2018);
  - Cefaleia – dor de cabeça frontal ou lateral em ambos os lados, pulsante ou não, sem outros sintomas neurológicos associados (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2018);
  - Enxaqueca simples (ES) – também conhecida como enxaqueca sem aura, é caracterizado por transtorno de cefaleia recorrente que se manifesta em crises com duração de 4 a 72 horas, com dor de localização unilateral, qualidade pulsátil, intensidade moderada ou grave, agravamento por atividade física de rotina e associação com náusea e/ou fotofobia e fonofobia (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2018);
  - Enxaqueca complicada (EC) também conhecida como enxaqueca com aura, é caracterizada por ataques recorrentes, com duração de minutos, sintomas visuais, sensoriais ou outros sintomas do sistema nervoso central totalmente

reversíveis que geralmente se desenvolvem gradualmente e são seguidos por cefaleia (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2018);

b) Autoimune

- Esclerose múltipla (EM);
- Esclerose lateral amiotrófica (ELA);

c) Infeccioso

- Infecção parasitária – causadas por toxoplasmose, cisticercose e esquistossomose;
- Infecção bacteriana – causada por tuberculose e sífilis;
- Infecção viral não-arbovirose (viral NA) – causada por vírus linfotrófico T humano (HTLV), Cítomegalovírus CMV *Herpes simplex* (HSV), Vírus Epstein–Barr (EBV) e Herpes zoster.
- Infecção viral por arbovirose (viral A) – causada por vírus ZIKV e CHIKV.

O número de pacientes que consiste cada grupo está descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Número de pacientes em relação as informações adquiridas do LCR.

Doença	Total de pacientes	Bioquímica do LCR	ELISA (sHLA-G)	LUMINEX® (moléculas solúveis)
Cefaleia	10	10	10	10
Enxaqueca simples	24	24	22	13
Enxaqueca complicada	39	39	39	28
Esclerose múltipla	13	13	12	8
Esclerose lateral amiotrófica	5	5	5	5
Infecção parasitária	8	8	7	8
Infecção bacteriana	13	13	12	4
Infecção viral não-arbovirose	30	30	30	22
Infecção viral arbovirose	5	0	5	5
Total de amostras por técnica	147	142	142	103

Fonte: o autor, 2021.

### 3.3 Determinação dos níveis de HLA-G solúvel no LCR

A quantificação de HLA-G foi realizada por ELISA com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G/9 (Exbio, Praga, República Checa). O ELISA baseia-se em reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas que permitem a detecção de anticorpos ou antígenos específicos.

Foram utilizadas placas de 96 poços com fundo plano sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de detecção, MEM-G/9: Mouse-a-human HLA-G mAb [10 µg/ml], diluído (1:100) em tampão fosfato - pH 7.2 (PBS 1X) e incubadas por 18 h à 4°C. Após a incubação as placas foram lavadas com 300 µL PBS Tween 20 a 0.1% e pH 7.2 (4x). Foi então adicionado 300 µL de diluente (DILUENT DAKO) e as placas foram novamente incubadas em agitação leve em temperatura ambiente por 2 horas.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com 300  $\mu$ L PBS Tween 20 a 0.1% e pH 7.2 (4x) e incubadas em leve agitação por 1 hora, com 50  $\mu$ L de LCR ou padrão. Foi adicionado a cada poço 50  $\mu$ L diluent Dako®, atingindo um volume final de 100  $\mu$ L. O padrão foi feito com a proteína HLA-G5 obtida do sobrenadante da cultura de células do hibridoma MEM9G5 e diluído em diluição seriada, da concentração 200 ng/mL a 12,5 ng/mL.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com 300  $\mu$ L PBS Tween 20 a 0.1% e pH 7.2 (4x). Foi adicionado 100  $\mu$ L anticorpo de revelação, Rabbit-anti-human  $\beta$ 2microglobulin, diluído (1:10.000) em PBS 1X e logo após, incubado em temperatura ambiente por 1 hora e novamente lavada com 300  $\mu$ L PBS Tween 20 a 0.1% e pH 7.2 (4x);

Foi adicionado 100  $\mu$ L de DAKO ENVISION System HRP rabbit Dako diluído (1:200) e incubado em agitação leve por 1 hora em temperatura ambiente e em sequência, as placas foram lavadas com 300  $\mu$ L PBS Tween 20 a 0.1% e pH 7.2 (4x). As placas foram incubadas protegidas da luz com 150  $\mu$ L TMB Sigma SUPER SENSITIVE por aproximadamente 20 minutos em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação para a revelação, foi adicionado 100  $\mu$ L HCl 1 N. A leitura da densidade óptica foi realizada no software MultiScan FC, num comprimento de onda de 450 nm.

### **3.4 Determinação dos níveis de moléculas solúveis no LCR**

A quantificação das moléculas solúveis no líquido cefalorraquidiano dos pacientes foi realizada através de ensaio baseado em esferas fluorescente LUMINEX® com kit multi-plex pré-formado (Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel, Invitrogen™ Thermo Fisher, Viena, Áustria). Esse imunoenensaio consiste no uso de dois tipos de anticorpos, primeiro um anticorpo de captura ligados a esferas magnéticas e um anticorpo biotinalado de detecção que emite fluorescência. Ambos os anticorpos se ligam as moléculas de interesse, em uma reação conhecida como “sanduiche”.

Todo o ensaio foi realizado protegido da luz em placas de 96 poço de fundo plano de baixa ligação onde foram adicionadas 25  $\mu$ L de esferas de anticorpo 1X. Após a adição das esferas os poços foram lavados duas vezes com 200  $\mu$ L de solução de lavagem 1X. Foram então adicionadas em sequência em cada poço 25  $\mu$ L de

tampão de incubação, 50 µL de padrão diluído em série (1:3), 50 µL de branco, 25 µL de Diluente de Ensaio seguido por 25 µL de amostra. As placas foram cobertas com tampa opaca por 2 horas à temperatura ambiente sob agitação em um agitador orbital.

Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de solução de lavagem 1X, logo após adicionado 50 µL de anticorpo detector biotinilado 1X e incubada por 1 hora em temperatura ambiente em um agitador de placa orbital.

Após a incubação as placas foram lavadas novamente duas vezes com 200 µL de solução de lavagem 1X, e 50 µL de solução de estreptavidina-RPE 1X foi adicionado imediatamente à cada poço de ensaio e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente em um agitador de placa orbital. Logo após os poços foram lavados três vezes com 200 µL/100 de solução de lavagem 1X.

As placas foram protegidas da luz e guardadas a 2°C a 8°C durante a noite para serem lidas no dia seguinte na plataforma LABScan3D™ (One Lambda™, Thermo Fisher, Califórnia, EUA) e do software xPOTENT®4.2. (Thermo Fisher, Califórnia, EUA).

### 3.5 Análise dos dados

Para as variáveis epidemiológicas do estudo, foram utilizados os parâmetros da Estatística Descritiva, a saber: distribuição de frequências absolutas e relativas, média, mediana, e desvio padrão. As amplitudes de variação, médias e desvios padrão de variáveis contínuas foram estimadas utilizando-se o *software* GraphPad Prism 5.0. Quando necessário a comparação de médias entre 2 grupos, foram aplicados os testes t de Student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não paramétricos foi baseada no resultado do teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade. Para estabelecer correlações foi usado o *software* SPSS aplicando o coeficiente de correlação de Spearman. Para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedeu 5% ( $p < 0,05$ ).

#### **4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Este estudo é um desdobramento do projeto Contribuição do polimorfismo da região promotora e expressão do HLA-G na resposta inadequada ao tratamento de primeira linha com interferon- $\beta$  em pacientes portadores de esclerose múltipla, que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz de Pernambuco, em obediência ao que preceitua a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e a Declaração de Helsinki VI, tendo o parecer aprovado (CAAE: 86325218.6.0000.5190) (ANEXO A).

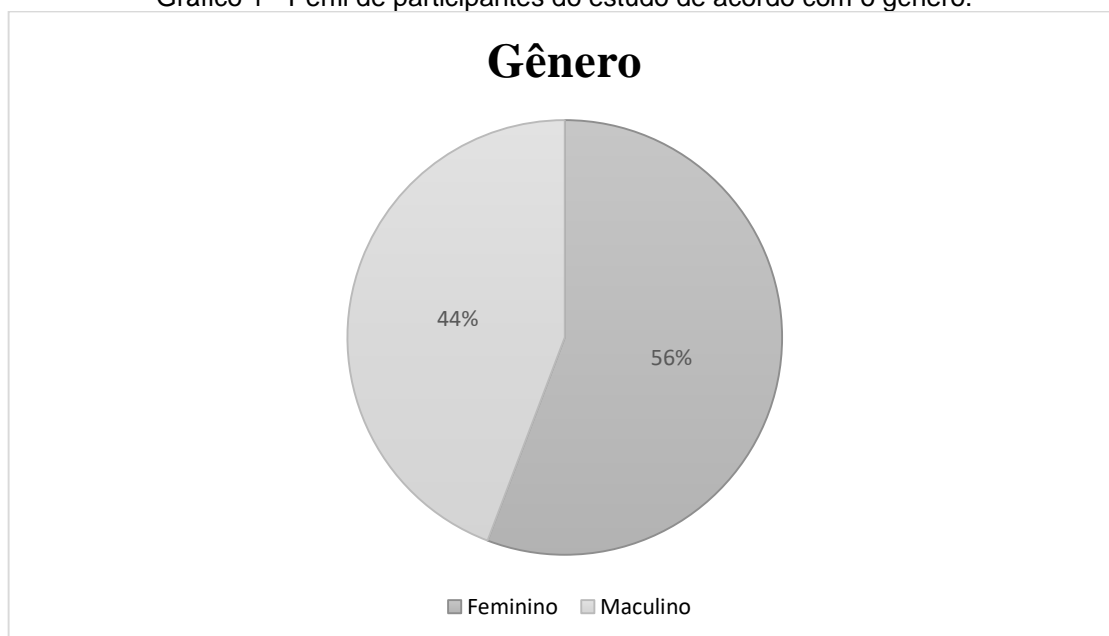
## 5 RESULTADOS

Os resultados serão descritos através do perfil de epidemiológico, perfil de moléculas imunológicas solúveis no LCR e nas correlações estabelecidas por essas moléculas.

### 5.1 Perfil Epidemiológico dos pacientes

O grupo total de voluntários recrutados consistiu de 147 pacientes, sendo estes 82 (56%) do gênero feminino e 65 (43%) do gênero masculino (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Perfil de participantes do estudo de acordo com o gênero.



Fonte: o autor, 2021.

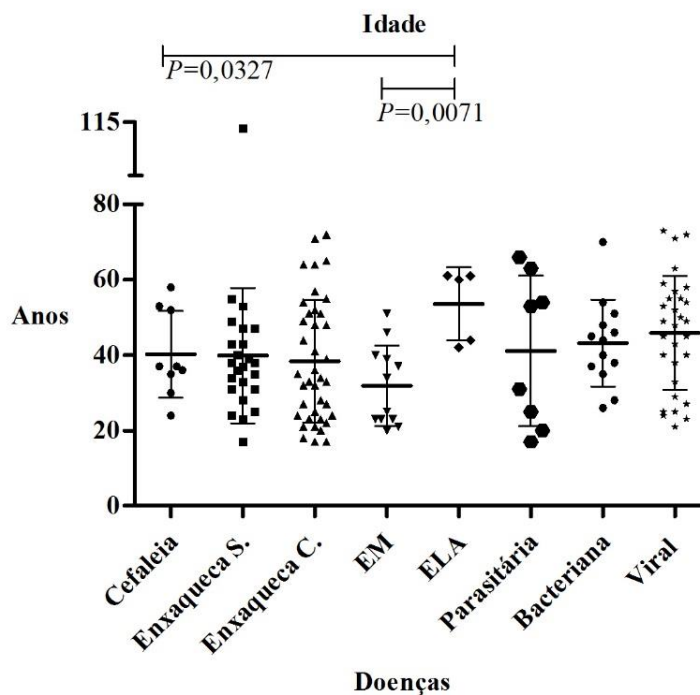
Legenda: A porcentagem de indivíduos do gênero feminino (56%) e masculino (44%) dentro do número total de pacientes recrutados.

Em relação a idade, os voluntários tinham entre 17 e 111 anos na data da coleta do LCR, com média de 40,2 anos e mediana de 38 anos. Quando relacionado a idade e a neuropatologia apresentada, as médias de idade na cefaleia, enxaqueca simples e complicada e nas infecções permaneceram similares. Os pacientes com esclerose múltipla foram os mais jovens, com média de 31,8 anos e mediana de 29, mas a diferença não atingiu significância ( $P= 0,1260$ ). Por sua vez, os pacientes com esclerose lateral amiotrófica foram os mais velhos ( $P= 0,0327$ ), com média de 53,6 anos e mediana de 60 anos. Quando comparadas as idades dos pacientes com



doença autoimune, portadores de EM e ELA, a significância é de  $P= 0,0071$  (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Perfil da população de estudo de acordo com a idade e neuropatologia apresentada.



Fonte: o autor, 2021.

Legenda: Médias e intervalo em anos: cefaleia (40,2; 24 – 58); enxaqueca simples (39,9; 17 – 111); enxaqueca complicada (38,4; 17-72); esclerose múltipla (31,8; 20 – 51); esclerose lateral amiotrófica (53,6; 42 – 61); infecção parasitária (41,1; 17 – 66); infecção bacteriana (43,3; 26 – 70); e infecção viral (45,8; 21 – 73).

## 5.2 Perfil celular e bioquímico do líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias

As análises bioquímica e citológica foram realizadas em cento e quarenta e dois diferentes LCR (Tabela 2).

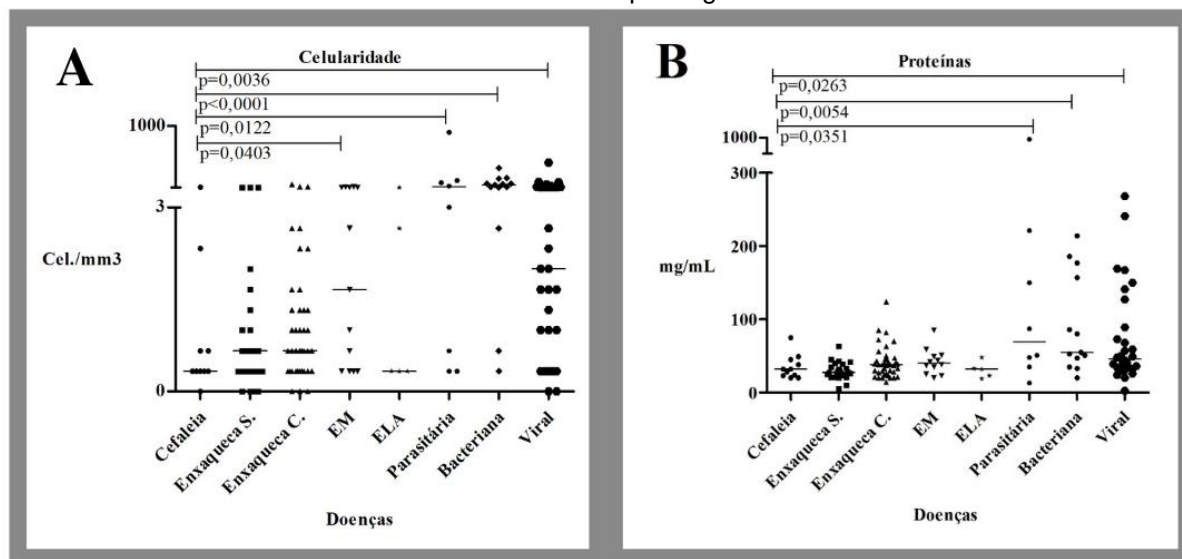
Tabela 2 - Valores de celularidade e concentração de cloreto, glicose e proteínas presente no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias.

Colunas1	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infecção Parasitária	Infecção Bacteriana	Infecção Viral	p(K-W)
<b>Amostras (n)</b>	10	24	39	13	5	8	13	30	
<b>Celularidade (cel./mm<sup>3</sup>)</b>									< 0,0001
Máxima	8	5,66	53,33	14,66	4	896	320	405,3	
Mínima	0	0	0	0,33	0,33	0,33	0,33	0	
Média	1,172	1,124	2,908	2,905	1,53	88,24	49,65	25,24	
Desvio padrão	1,936	1,522	8,265	3,902	1,612	235,6	73,49	75,95	
Mediana	0,33	0,66	0,66	1,33	0,33	3	13	2	
<b>Cloreto (mg/ml)</b>									0,0676
Máxima	747	737	750	749	692	750	713	750	
Mínima	663	607	628	659	659	655	647	650	
Média	704,1	696,2	706,2	690,3	673	696,1	685,5	690,7	
Desvio padrão	24,18	33	28,45	25,05	15,31	32,09	20,59	31,08	
Mediana	707	708,5	708	688	669	685,5	694	686	
<b>Glicose (mg/ml)</b>									0,4619
Máxima	99	112	95	86	101	97	92	124	
Mínima	57	49	48	55	55	35	4	24	
Média	73,82	72,88	70,59	66,83	75,2	69,13	55,31	70,6	
Desvio padrão	13,19	17,24	10,63	8,59	19,06	19,02	24,38	20,42	
Mediana	72	70	69	66	75	69	62	69	
<b>Proteína (mg/ml)</b>									< 0,0001
Máxima	63	124	85	26	48	942	214	268	
Mínima	5	14	20	22	19	13	20	2,442	
Média	29,63	40,83	42,33	23,67	31	193,4	91,85	75,63	
Desvio padrão	12,05	21,64	17,82	2,082	11,2	310,2	66,99	65,76	
Mediana	27,5	38	40	23	32	69	55	48	

Fonte: o autor, 2021.

A análise comparativa da citologia líquórica nas diferentes patologias revelou que a mediana do número de células por milímetros cúbicos no LCR dos pacientes com infecção de qualquer origem (bacteriana, viral ou parasitária) e em portadores de esclerose múltipla é significativamente maior do que aqueles com cefaleia (Gráfico 3A). A principal alteração na avaliação bioquímica do LCR refere-se ao aumento da concentração de proteínas nos quadros infecciosos comparados ao grupo referência com cefaleia (Gráfico 3B).

Gráfico 3 - Características celular e proteica gráficos do líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias.



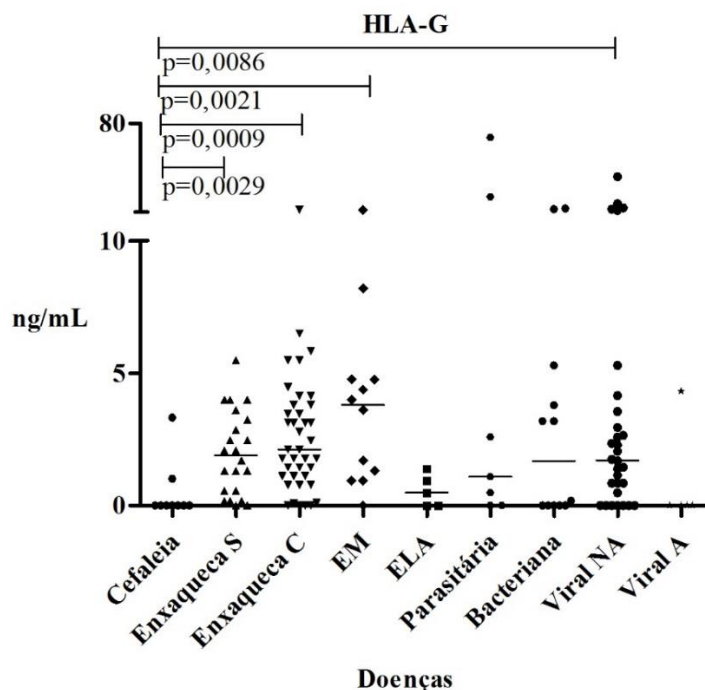
Fonte: o autor, 2021.

Legenda: (A) gráfico da concentração de cel./mm<sup>3</sup> cúbico em relação as diferentes neuropatologias; (B) gráfico da concentração de proteínas em mg/mL em relação as diferentes neuropatologias.

### 5.3 Perfil da molécula imunorregulatória HLA-G solúvel no líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias

O HLA-G solúvel (sHLA-G) foi encontrado significativamente aumentado em relação ao grupo cefaleia no LCR dos pacientes com enxaqueca simples ( $P=0,0029$ ) e complicada ( $P=0,0009$ ), esclerose múltipla ( $P=0,0021$ ) e infecção viral não arbovirose ( $P=0,0086$ ), como demonstrado no gráfico 4. Quando comparado ao grupo cefaleia, as infecções parasitárias e bacterianas, apresentaram aumento na concentração de HLA-G solúvel no LCR, mas essa diferença não é estatisticamente significativa ( $P=0,062$  e  $P=0,0832$ , respectivamente). Por sua vez, os níveis da sHLA-G no LCR de pacientes com ELA não foram diferentes daqueles com cefaleia ( $P=0,3512$ ).

Gráfico 4 - Perfil da concentração de HLA-G solúvel em ng/mL no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes patologias.



Fonte: o autor, 2021.

Nota: Os níveis de sHLA-G estão aumentados em enxaqueca simples ( $P=0,0029$ ), enxaqueca complicada ( $P=0,009$ ), esclerose múltipla ( $P=0,0021$ ) e infecção viral não-arbovirose ( $P=0,0086$ ).

#### 5.4 Perfil das demais moléculas solúveis no líquido cefalorraquidiano em diferentes patologias

Das trinta e cinco moléculas analisadas, dezoito (IL-1 $\beta$ , G-CSF, IL-10, IL-13, Eotaxim, GMCSF, IL-15, EGF, IL-5, HGF, VEGF, IL-1 $\alpha$ , IL-17F, IFN- $\alpha$ , IL-3, IL-2R, IL-22 e IL-4) não foram detectáveis no LCR de pacientes com cefaleia, enxaqueca simples e complicada, doença autoimune ou doença infecciosa parasitária, bacteriana e viral, excluindo arbovirose.

Entre as dezessete moléculas detectadas, doze foram encontradas no LCR de todos os indivíduos em todas as patologias (FGF-básico, IL-2, RANTES, IL-17A, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, IL-9, IL-1RA, TNF $\alpha$ , IL-12, IL-7 e MIG). Entretanto, os níveis dessas moléculas são variáveis entre as diferentes patologias. Ainda foi observado que entre as cinco moléculas restantes (IL-6, MIP-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IP-10 e IL-8) a frequência da expressão dessas moléculas é variável nas diferentes patologias (Tabela 3), e há variação dos níveis presentes no LCR dos pacientes com mesma patologia. Todas as

moléculas analisadas no estudo e suas significâncias podem ser encontradas no apêndice B.

Tabela 3 - Presença de moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano de acordo com a neuropatologia apresentada.

Moléculas solúveis	Cefaleia	Enxaqueca Simples	Enxaqueca Complicada	Esclerose múltipla	EL A	Infecciosa parasitária	Infecciosa bacteriana	Infecciosa viral NA
<b>Presente</b>								
<b>IL-6</b>	33,3%	7,7%	7,1%	-	-	25%	-	27,3%
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	-	-	3,6%	-	-	12,5%	-	4,5%
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	-	-	-	-	-	-	-	9,1 %
<b>IP-10</b>	33,3%	7,7%	25%	14,28 %	-	37,5 %	-	31,8%
<b>1L-8</b>	33,3%	23,1%	10,7%	-	-	37,5%	-	36,4%

Fonte: o autor, 2021.

Os níveis do fator de crescimento fibroblástico básico (FGF-basic) ( $P=0,0102$ ), do ligante 5 da quimiocina CC, conhecido como CCL5 ou RANTES ( $P=0,0012$ ), IL-7 ( $P=0,0386$ ) e IL-2 ( $P=0,0166$ ) estão diminuídos no grupo infecção viral NA quando comparado ao grupo cefaleia (Gráfico 5 A-D).

De forma semelhante em infecções virais NA e em infecções bacterianas, os níveis de IL-17A ( $P=0,0011$  e  $P=0,0108$ ), e TNF $\alpha$  ( $P=0,0033$  e  $P=0,0362$ ) apresentaram-se diminuídos no LCR em relação aos pacientes com cefaleia. Ademais, os níveis de IL-1RA estão aumentados ( $P=0,0249$ ) em infecções bacterianas (Gráfico E-G).

A proteína 1 do monócito quemottractante, conhecida como MCP-1 ou CCL-2, apresentou-se com níveis significativamente mais baixos nos grupos EM ( $P=0,0095$ ), ELA ( $P=0,007$ ), infecção parasitária ( $P=<0,0001$ ), bacteriana ( $P=0,0503$ ) e viral NA ( $P=0,0014$ ) na comparação com o grupo cefaleia. Da mesma forma, os níveis da IL-9 estão abaixo dos encontrados no grupo cefaleias nos grupos ELA ( $P=0,0327$ ), infecção parasitária ( $P=0,0267$ ), bacteriana ( $P=0,0108$ ) e viral NA ( $P=0,0003$ ) (Gráficos H e I).

As moléculas inflamatórias IL-6, IL-8 e IP-10 não foram detectadas em doença autoimune EM e ELA, ou infecção bacteriana, mas foram detectadas em diferentes níveis em cerca de 30% dos casos de cefaleia e infecção parasitária e viral NA, não permitindo a análise comparativa dos níveis encontrados em diferentes patologias.

Em relação a arbovirose, foram observados três perfis de moléculas: (i) as proteínas detectadas apenas em LCR de pacientes com arbovirose; (ii) as proteínas detectadas em níveis semelhantes àqueles observados no grupo cefaleia, e (iii) as proteínas detectadas em níveis significativamente diferentes daqueles observados no grupo cefaleia, incluindo IL-7 ( $P=0,0033$ ), IL-9 ( $P=0,0453$ ), IL-17A ( $P=0,0033$ ) e IP-10 ( $P=0,0520$ ) (APÊNDICE B).

Gráfico 5 - Concentração das moléculas imunológicas solúveis em pg/mL presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias

(continua)

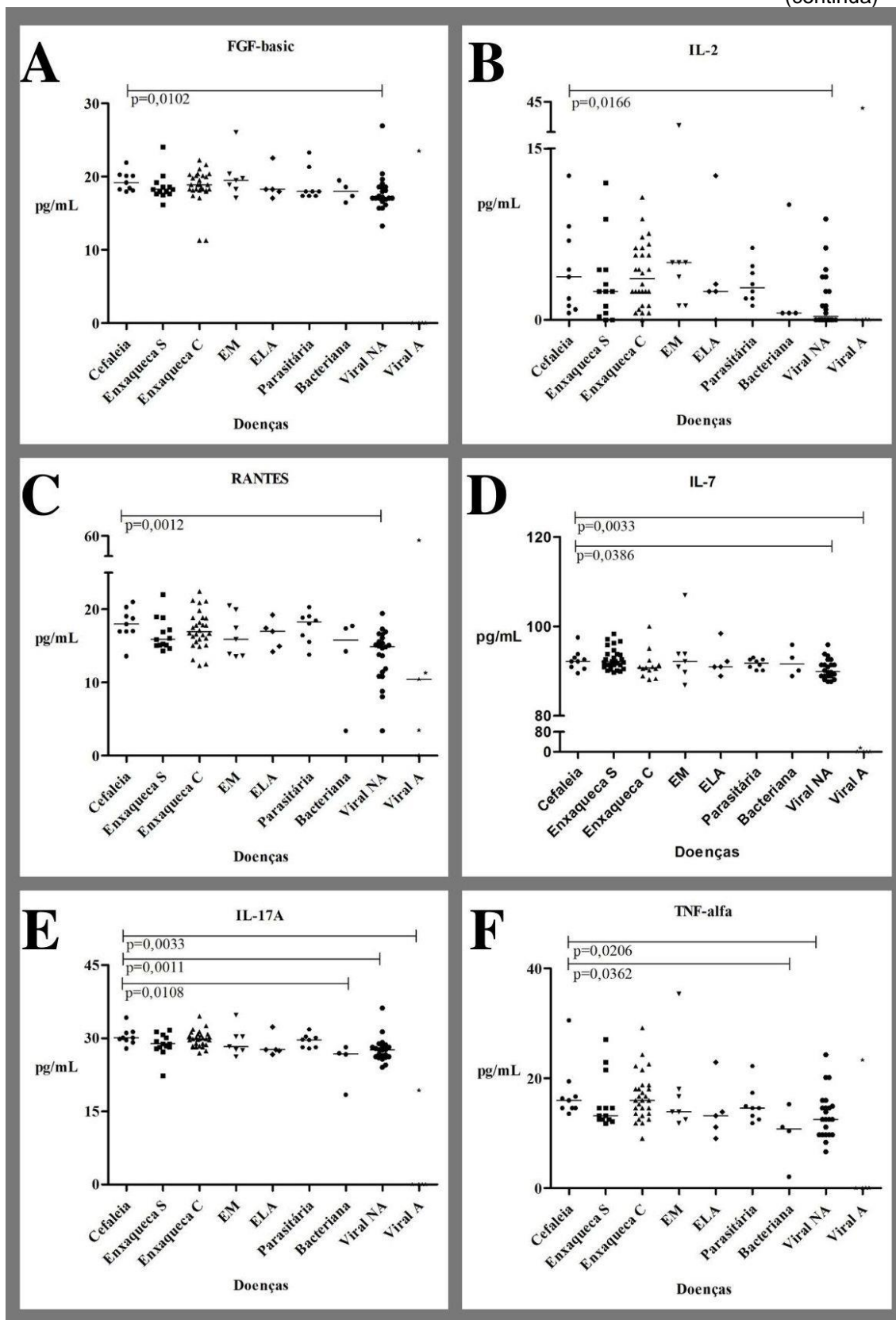
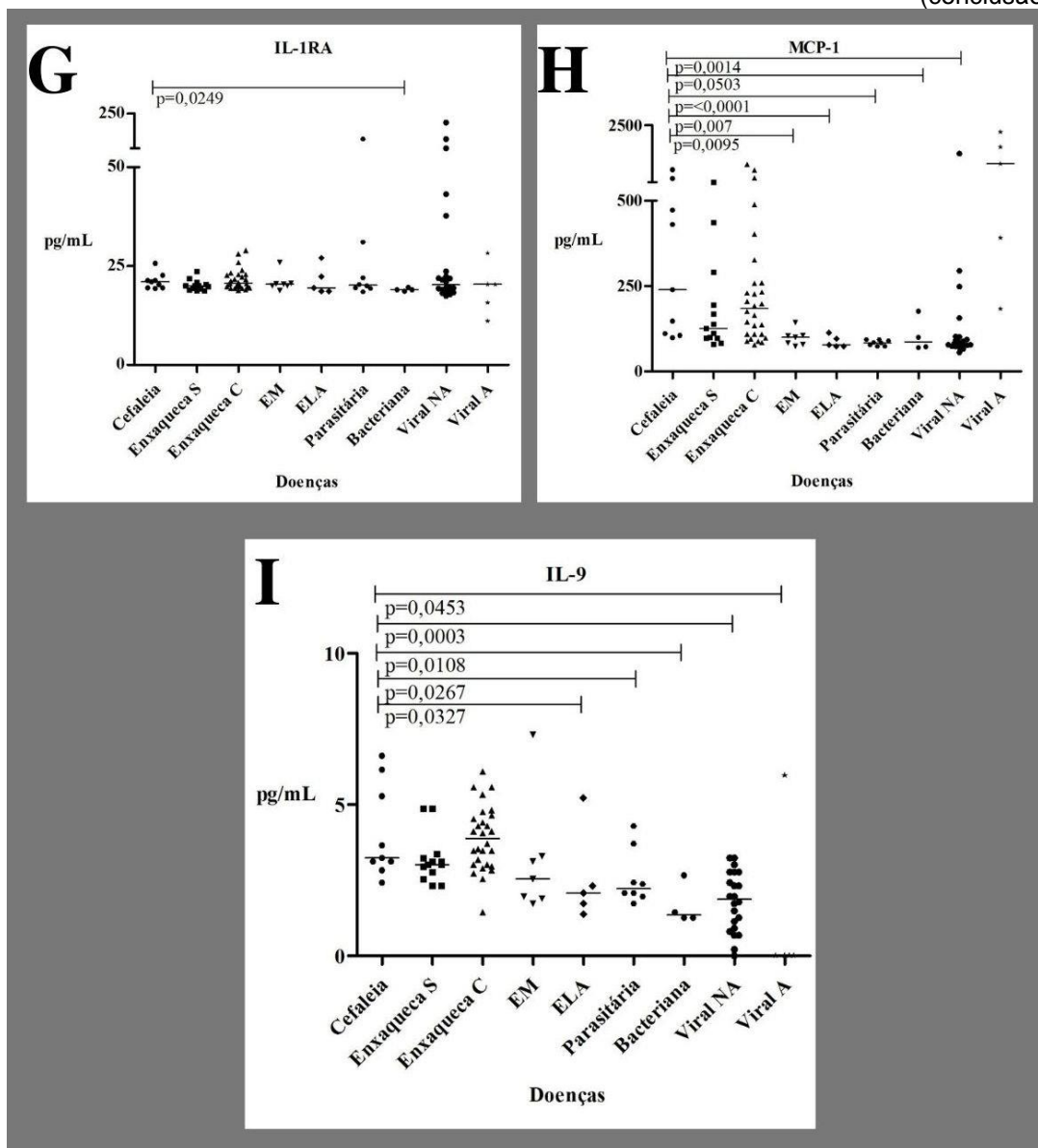


Gráfico 6 - Concentração das moléculas imunológicas solúveis em pg/mL presentes no líquido cefalorraquidiano de pacientes com diferentes neuropatologias

(conclusão)



Fonte: o Autor, 2021.

Legenda: (A) FGF-basic; (B) IL-2; (C) RANTES; (D) IL-7; (E) IL-17A; (F) TNF $\alpha$ ; (G) IL-1RA; (H) MCP-1; (I) IL-9.

### 5.5 Correlações entre moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano

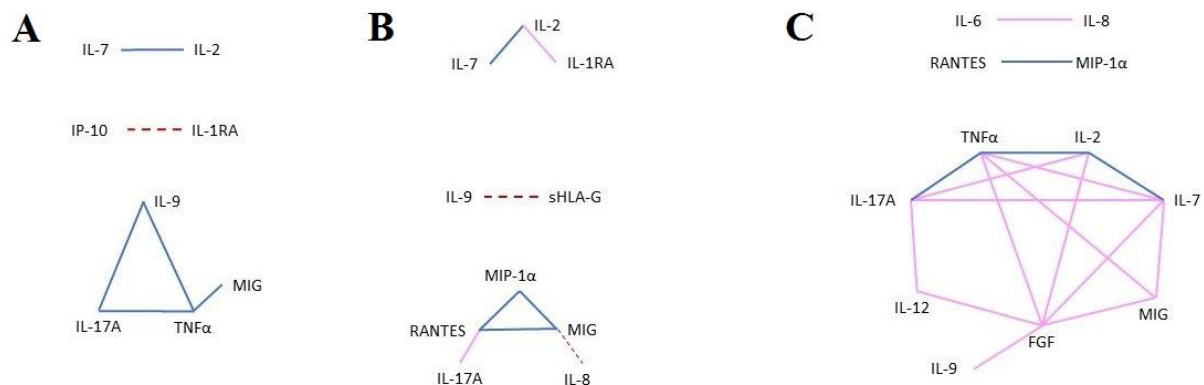
Na cefaleia, IP-10 e IL-1RA se correlacionam negativamente ( $\rho=-0,809$ ), enquanto que IL-2 e IL-7 se correlacionam positivamente ( $\rho=+0,887$ ). É observado também que MIG influencia positivamente TNF $\alpha$  ( $\rho=+0,826$ ), que por sua vez, influencia IL-17A e IL-9 ( $\rho=+0,851$  e  $\rho=+0,868$ , respectivamente) esses últimos também apresentam correlação positiva um com o outro ( $\rho=0,958$ ) (Figura 4A).



Na enxaqueca simples, os níveis de sHLA-G estão aumentados em relação a cefaleia e regulam negativamente a IL-9 ( $\rho=-0,825$ ). Apesar de, assim como na cefaleia, a IL-2 influenciar positivamente IL-7 ( $\rho=+0,832$ ), na enxaqueca simples essa citocina também exerce influência moderada na IL-1RA ( $\rho=+0,694$ ). A IL-8 exerce influência negativa sobre a MIG ( $\rho=-0,739$ ) que por sua vez influencia positivamente MIP-1 $\alpha$  e RANTES ( $\rho=+0,825$  e  $\rho=+0,879$ , respectivamente) e esta última modula moderadamente IL-17A ( $\rho=+0,689$ ) (Figura 4B).

Na enxaqueca complicada, os níveis de sHLA-G estão significativamente aumentados, porém essa molécula não parece exercer influência específica em nenhuma outra molécula. Assim como na cefaleia, encontra-se uma forte correlação positiva entre IL-2 e IL-7 ( $\rho=+0,862$ ) e TNF $\alpha$  e IL-17A ( $\rho=+0,864$ ). Uma forte correlação positiva também é encontrada entre RANTES e MIP-1 $\alpha$  ( $\rho=+0,801$ ) e IL-2 e TNF $\alpha$  ( $\rho=+0,828$ ). Nessa patologia, quinze diferentes moléculas se correlacionam formando uma rede de conexões complexa, mas apenas as moléculas citadas acima apresentam correlações fortes ( $\rho \geq 0,8$ ), as demais variam entre correlações fracas a moderadas ( $\rho < 0,8$ ) (Figura 4C).

Figura 4 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis



Fonte: o autor, 2021.

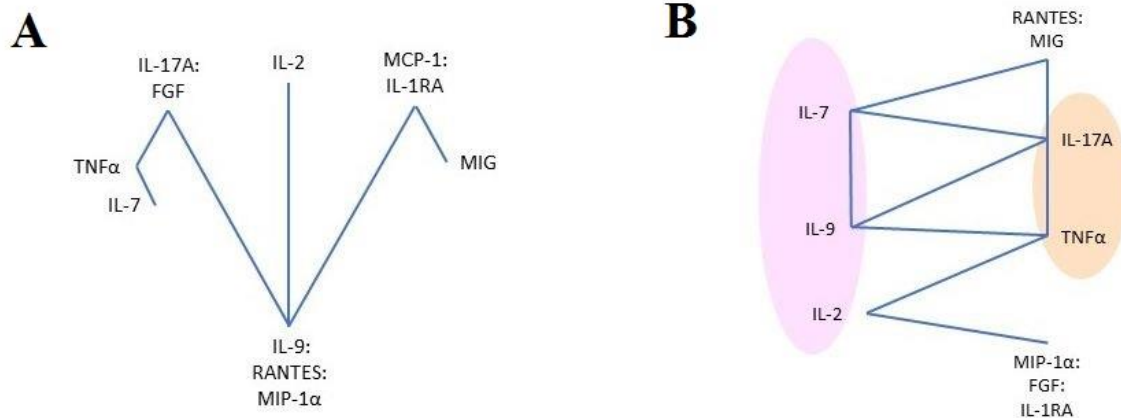
Legenda: Correlação entre moléculas solúveis dos pacientes com (A) cefaleia [ $n = 9$ ;  $\rho \geq 0,809$  a  $0,958$ ;  $P < 0,01$ ], (B) enxaqueca simples [ $n=13$ ;  $\rho = 0,689$  a  $0,879$ ;  $P < 0,01$ ] e (C) enxaqueca complicada [ $n=28$ ,  $\rho (+) = 0,480$  a  $0,864$ ;  $P < 0,01$ ]. As linhas pontilhadas em vermelho representam as correlações negativas, em azul escuro as correlações com  $\rho \geq 0,8$  e em rosa correlações com  $\rho$  entre  $0,6$  e  $0,79$ . Correlações com  $\rho < 0,6$  e/ou  $P > 0,01$  foram desconsideradas no diagrama.

Na doença autoimune, EM e ELA, observa-se uma diminuição significativa de MCP-1, que, aparentemente, não exerce influência nos níveis de moléculas solúveis em cefaleia. Porém, na ELA, a MCP-1 apresenta uma forte correlação positiva com MIG e IL-1RA ( $\rho=+0,975$  e  $\rho=+0,975$ ) e também com MIP-1 $\alpha$  ( $\rho=+0,975$ ),

RANTES ( $\rho=+0,975$ ) e IL-9 ( $\rho=+0,975$ ), esta última também foi encontrada em menores níveis na ELA do que em cefaleia (Figura 5A).

Por sua vez em EM, apesar de sHLA-G e a IL-12 estarem aumentadas em relação a cefaleia, o sHLA-G não aparece correlacionado a outras moléculas, enquanto o IL-12 se correlaciona positivamente com IL-2 ( $\rho=+0,820$ ), FGF, MIP-1 $\alpha$  e IL-1RA ( $\rho=+0,880$ ), porém com uma significância de  $P\leq 0,05$ . Entretanto, MIP-1 $\alpha$ , FGF e IL-1RA estabelecem forte correlação positiva entre si ( $\rho=+1$ ) e com IL-2 ( $\rho=+0,926$ ) e, esta, com TNF $\alpha$  ( $\rho=+0,926$ ). Comportamento similar é encontrado entre RANTES e MIG ( $\rho=+1$ ), que também se correlacionam fortemente com IL-7 ( $\rho=+0,986$ ) e IL17A ( $\rho=+0,928$ ) (Figura 5B).

Figura 5 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis



Fonte: o autor, 2021.

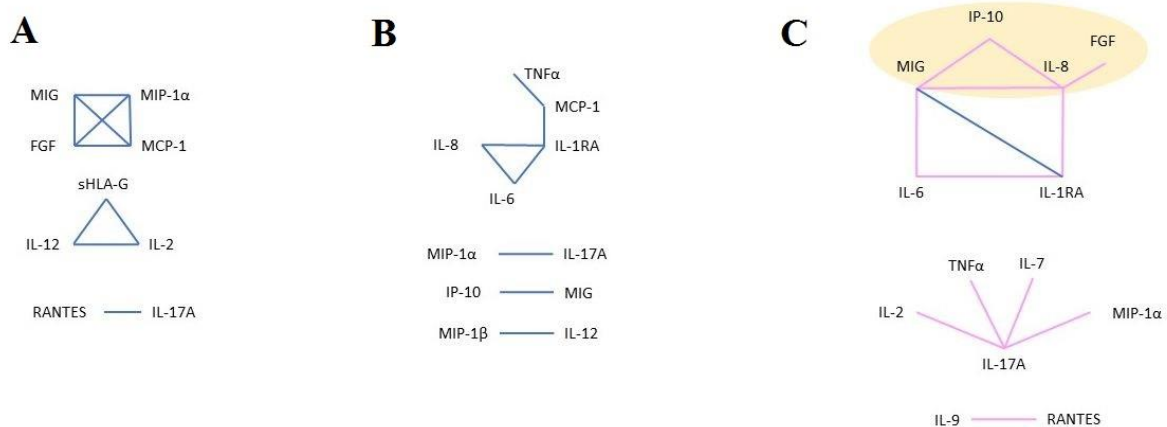
Legenda: Correlação entre as moléculas solúveis dos pacientes portadores de (A) esclerose lateral amiotrófica (ELA) [ $n=5$ ;  $\rho (+) \geq 0,975$ ;  $P < 0,01$ ] e (B) esclerose múltipla (EM) [ $n=6$ ;  $\rho (+) \geq 0,926$ ;  $P < 0,01$ ]. Em destaque rosa estão citocinas envolvidas na proliferação celular, em destaque laranja estão citocinas envolvidas na resposta inflamatória. As linhas em azul escuro representam as correlações com  $\rho \geq 0,8$ . Correlações com  $\rho < 0,6$  e/ou  $P > 0,01$  foram desconsideradas no diagrama.

Devido a limitações no volume de amostras disponibilizado, só foi possível estabelecer as correlações das moléculas solúveis no LCR dos pacientes com sífilis dentro do grupo das infecções bacterianas. Neste grupo os níveis de MCP-1 estão diminuídos em relação a cefaleia e tem forte correlação com MIG, FGF e MIP-1 $\alpha$  que também se correlacionam entre si ( $\rho=+1$ ). A IL-17A também se apresenta diminuída e exerce forte influência em RANTES ( $\rho=+1$ ). O sHLA-G se apresenta aumentado, mas não significativamente ( $p=0,08$ ), e junto com IL-12 e IL-2 se influenciam fortemente de maneira positiva ( $\rho=+1$ ) (Figura 6A).

Assim como na sífilis, nas infecções parasitárias a MCP-1 está diminuída, mas neste grupo se correlaciona com TNF $\alpha$  e IL-1RA (rho=0,836 e rho=0,880). A IL-1RA, a IL-8 e a IL-6 (rho=0,969, rho=0,873 e rho=0,846) se correlacionam positivamente. Também há correlação entre MIP-1 $\alpha$  e IL-17A (rho=+0,880), IP-10 e MIG (rho=0,846) e MIP-1 $\beta$  e IL-12 (rho=+1) (Figura 6B).

Na infecção viral não-arbovirose apenas MIG e IL-1RA estabelecem uma forte correlação positiva (rho=+0,813). As demais correlações estabelecidas são de fraca a moderada, como a IL-17A que aparece diminuída em relação a cefaleia e se correlaciona moderadamente com TNF $\alpha$  (rho=+0,626), IL-2 (rho=+0,665), IL7 (rho=+0,635) e MIP-1 $\alpha$  (rho=+0,721) e a IL-9, que também se apresenta diminuída e influencia a RANTES (rho=+0,636). As demais correlações podem ser observadas na Figura 6C.

Figura 6 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis



Fonte: o autor, 2021.

Legenda: Correlação entre moléculas solúveis dos pacientes com (A) sífilis [n=4; rho =1,0; P<0,01], (B) infecção parasitária Parasitas [Toxoplasmose (n=3); Esquistossomose (n=3); Cisticercose (n=2) rho (+)  $\geq$ 0,836; P<0,01] e (C) infecção viral não-arbovirose [n=22; rho (+)  $\geq$  0,541 a 0,8 ; P<0,01]. Em destaque amarelo estão quimiocinas envolvidas na migração celular. As linhas pontilhadas em azul escuro representam as correlações com rho $\geq$ 0,8 e em rosa correlações com rho entre 0,6 e 0,79. Correlações com rho<0,6 e/ou P>0,01 foram desconsideradas no diagrama.

## 6 DISCUSSÃO

Dentre as 12 moléculas presentes no LCR de todos pacientes, IL-12, MIG e MIP-1 $\alpha$  foram detectadas em níveis semelhantes em todas as patologias. A IL-12 é uma interleucina produzida por diversas células hematopoiéticas e foi encontrada exercendo influencia na diferenciação das células T naive (SUN et al., 2015). Por sua vez, a MIG e a MIP-1 $\alpha$  são quimiocinas envolvidas na migração celular e produzidas pelas células endoteliais cerebrais (CHUI; DOROVINI-ZIS, 2010; LIND; ERIKSSON; GRAHN, 2019).

Devido a limitações por questões éticas, não foi possível obter amostras de LCR de indivíduos imunocompetentes saudáveis. Portanto, foram considerados nesse estudo como grupo de comparação os pacientes diagnosticados com cefaleia primária, sem qualquer associação com outra neuropatologia, que foram submetidos a punção lombar durante a investigação do quadro sintomático.

Em cefaleia, o TNF $\alpha$ , uma molécula constitutiva no SNC e conhecida pela indução e manutenção da inflamação (PROBERT, 2015), se correlaciona positivamente com outras moléculas constitutivas do SNC, como as citocinas IL-17A e IL-9, moléculas responsáveis pela regulação da inflamação e proliferação celular (ROJAS-ZULETA; SANCHEZ, 2017; WAISMAN; HAUPTMANN; REGEN, 2015), e a quimiocina MIG. Esses resultados corroboram as evidências de que TNF $\alpha$  possui um importante papel na homeostase imunológica no SNC (MCCOY; TANSEY, 2008; PROBERT, 2015). Outro ponto observado é a correlação forte e negativa entre a IL-1RA e a IP-10. O IL-1RA, antagonista do receptor IL-1 é produzido pela micróglia e apresenta função redutora da inflamação (OH et al., 2018). Por sua vez, a IP-10 é uma molécula constitutiva do ambiente cerebral com propriedade quimiotractorante, relacionada a migração de células T. Um estudo com camundongos knockout para IP-10 mostrou que esses animais exibem suscetibilidade aumentada à encefalite autoimune experimental (EAE) (KLEIN et al., 2003). Em outro estudo, dessa vez com anticorpos bloqueadores de função em ratos, foi observado o agravamento da EAE (NARUMI et al., 2002). Essas evidências sugerem que a IP-10 está envolvida na regulação da resposta imune no SNC.

As citocinas IL-2 e IL-7 aparecem em todas as condições de dor de cabeça primária (cefaleia, enxaqueca simples e complicada) fortemente correlacionadas ( $\rho > 0,8$ ). Essas moléculas são conhecidas por se ligarem à subunidade gama do

receptor IL-2, assim como a IL-4, IL-9, IL-15 e IL-21 (LIN; LEONARD, 2017). Estudos sugerem que tanto a IL-2 e IL-7 estão relacionadas a infiltração, crescimento e diferenciação de células T e regulação da resposta imune (HUANG; MEOLA; PETITTO, 2011. LIN et al., 2017; PONCHEL; CUTHBERT; GOËB, 2011).

Na enxaqueca simples, as quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIG apresentam correlação positiva forte e recíproca. Essas moléculas são responsáveis pelo tráfico celular através da BBB 89(UBOGU et al., 2006; WATSON et al., 2020). Entretanto, na enxaqueca complicada, apenas RANTES e MIP-1 $\alpha$  se correlacionam positiva e fortemente, enquanto MIG se correlaciona moderadamente com o TNF $\alpha$  que por sua vez, se mantém correlacionado positivamente a IL-17A e nos mesmo níveis encontrados em cefaleia (APÊNDICE B), sugerindo um importante papel dessas moléculas na regulação da resposta imune no ambiente do SNC.

A IL-8, uma quimiocina recrutadora de neutrófilos e envolvida na morte celular de oligodendrócitos e células precursoras neurais (WATSON et al., 2020), se correlaciona moderadamente de maneira positiva com a IL-6. A IL-6 é uma molécula moduladora da inflamação associada à cronicidade, neurodegeneração e desmielinização (WEST et al., 2019) e apresenta níveis significativamente menores em enxaqueca complicada do que em cefaleia, sugerindo que há uma atividade supressora da inflamação em enxaqueca complicada.

Por outro lado, o HLA-G, uma conhecida molécula reguladora da resposta imune (HUANG et al., 2010), apresenta um aumento significativo em ambas as enxaquecas em relação à cefaleia, sugerindo um equilíbrio na resposta inflamatória em enxaqueca complicada. O sHLA-G apresentou níveis aumentados de acordo com a gravidade da enxaqueca apresentada e, em enxaqueca simples, aparece regulando a IL-9. Em um estudo *in vitro* o HLA-G suprimiu a proliferação de células T (MORANDI et al., 2020). Em outro estudo *in vitro* o HLA-G também mostrou ação supressora na proliferação de neutrófilos (MOCIORNITA et al., 2018). Essas evidências corroboram a ação supressora da resposta inflamatória e da proliferação celular do HLA-G.

Nas doenças autoimunes, o MCP-1 está significativamente diminuído tanto em EM quanto em ELA comparado à cefaleia. A MCP-1 é uma quimiocina responsável por direcionar a migração de leucócitos pela BBB e o seus baixos níveis são associados aos episódios agudos recorrentes e às lesões no SNC na EM (CHUI; DOROVINI-ZIS, 2010; MATSUSHITA et al., 2013). Entretanto, em EM a MCP-1 não se correlaciona fortemente com nenhuma outra molécula, enquanto que em ELA a

MCP-1 apresenta correlação positiva forte com MIG. A MIG apresenta níveis menores em ELA quando comparado à cefaleia próximo a significância ( $P=0,0712$ ), enquanto que IP-10 não foi detectável. Em um estudo com camundongos com EAE demonstrou que a MIG estava presente principalmente dentro e imediatamente ao redor dos infiltrados de leucócitos, enquanto que IP-10 foi observado predominantemente associado a mais células parenquimatosas distais que circundavam a lesão inflamatória (CARTER et al., 2007). Na EM, nem a MIG nem a IP-10 aparecem em níveis significativamente alterados em relação à cefaleia. Essas evidências sugerem que as moléculas MIG e IP-10 são responsáveis pelo menor número de células na ELA e maior na EM e corroboram o caráter não-imunomediado da ELA.

Outro ponto interessante a ser discutido são os níveis de sHLA-G e IL-9. Os níveis de sHLA-G estão significativamente aumentados em EM, enquanto que em ELA não apresentam diferença estatística quando comparados à cefaleia. Por sua vez, os níveis de IL-9 estão significativamente diminuídos em ELA e não em EM o que também pode estar relacionado ao menor número de células presente no LCR dos pacientes com ELA que em EM uma vez que há evidências da ação indireta da IL-9 na promoção da migração de células Th17 nos locais da inflamação na EAE e do agravamento da doença (ZHOU et al., 2011).

Além do maior número de células presente no LCR dos pacientes com EM quando comparado aos com cefaleia, é observado um grupo de conhecidas moléculas inflamatórias se correlacionando fortemente, são elas a IL-7, IL-17A, IL-9, TNF $\alpha$  e IL-2, formando um grupo inflamatório ativo nessa patologia (Figura 5B). Esse grupo também se correlaciona fortemente com RANTES, MIG, MIP-1 $\alpha$ , FGF e IL-1RA. As evidências apresentadas neste e nos parágrafos acima confirmam a caracterização da EM como doença inflamatória e sugerem importante influência das moléculas quimiotractantes na inflamação.

Na neuroinfecção por sífilis é observado uma forte correlação entre as quimiocinas MIG, MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  e o fator de crescimento FGF-basic ( $\rho=1$ ). O FGF-basic, também conhecido como FGF2, tem função reparadora e regula a sobrevivência, divisão, diferenciação e migração celular (NURATA et al., 2009). Esse grupo de moléculas parece exercer um papel essencial na neuroinfecção, uma vez que entre os grupos estudados, o grupo infecção bacteriana foi o que apresentou a maior concentração de células por milímetro cúbico no LCR dos pacientes (Gráfico 3A).

A citocina IL-17A foi encontrada em menores níveis em sífilis que em cefaleia, esse achado se opõe à outro estudo onde foram encontrados níveis elevados de IL-17A no LCR de pacientes com sífilis assintomática (PASTUSZCZAK et al., 2013). Porém, é importante ressaltar que os pacientes do grupo sífilis do presente estudo eram todos sintomáticos e HIV-negativo. O artigo citado sugere que a IL-17A está envolvida na inflamação através das células T-helper, o que é corroborado pela forte correlação positiva estabelecida entre IL-17A e RANTES (Figura 6A), uma vez que RANTES é uma quimiocina envolvida na migração de células T-helper (UBOGU et al., 2006).

Apesar de não estaticamente significativa, o sHLA-G está aumentado na sífilis em relação à cefaleia ( $P=0,08$ ) e estabelece forte correlação positiva com IL-12 e IL-2. Tanto IL-2 quanto IL-12 não apresentam níveis significativamente diferentes dos encontrados em cefaleia e estão envolvidas na diferenciação de células T (HUANG; MEOLA; PETITTO, 2011; SUN et al., 2015). Em um estudo com LCR de pacientes, foi observado que IL-2 e IL-12 estavam em níveis mais baixos nos pacientes com neurosífilis do que os com sífilis sem comprometimento neurológico (YAN et al., 2017). Com base neste achado da literatura é possível inferir que o HLA-G está envolvido na supressão da produção de IL-2 e IL-12.

Na infecção parasitária MIP-1 $\alpha$  e IL-17A, IP-10 e MIG, e MIP-1 $\beta$  e IL-12 apresentam uma forte correlação positiva. Todas essas moléculas estão envolvidas na migração (CARDONA; GONZALEZ; TEALE, 2003) ou na diferenciação das células T e no desenvolvimento da inflamação (SUN et al., 2015; ZIMMERMANN et al., 2013). Outro grupo de correlação fortemente estabelecido nas infecções parasitárias é o composto por TNF $\alpha$ , MCP-1, IL-1RA, IL-6 e IL-8. Em um estudo *in vitro* foi observado que TNF- $\alpha$  aumentou a secreção de MCP-1, IL-8 e IP-10 que impulsionou o influxo de linfócitos do SNC, contribuindo para a formação de citocinas do tipo Th1 (UDDIN et al., 2005). Essas evidências sugerem uma resposta imune liderada por células T em resposta à infecção parasitária no SNC.

Nas infecções virais não-arbovirose a IL-9 e a RANTES apresentam correlação moderada e ambas estão significativamente diminuídas em relação à cefaleia. Também apresenta diminuição a IL-17A que se correlaciona moderadamente com IL-2, IL-7, TNF $\alpha$  e MIP-1 $\alpha$ . Destas, IL-2 e IL-7 também apresentam níveis significativamente menores no LCR dos pacientes com infecção viral não-arbovirose quando comparado com os pacientes com cefaleia. Por sua vez, o FGF-basic está

diminuído em infecção viral NA e influencia moderadamente IL-8, IP-10, MIG e IL-1RA. A MIG e a IL-1RA apresentam uma forte correlação positiva entre si e moderada com IL-6. Todas essas correlações demonstram que as quimiocinas envolvidas na migração de células T e neutrófilos (LIND; ERIKSSON; GRAHN, 2019; WATSON et al., 2020) influenciam diretamente as citocinas inflamatórias (PROBERT 2015; ZHOU et al., 2011).

Outro ponto a ser observado é o aumento significativo do sHLA-G em comparação à cefaleia e à infecção viral arbovirose. Apesar de não estabelecer correlação significativa com nenhuma outra molécula, o HLA-G pode ser responsável pela diminuição das moléculas inflamatórias IL-9, IL-7, IL-2 e IL-17A na infecção viral NA (APÊNDICE B).

Na infecção por arbovirose foram detectadas no LCR dos pacientes 10 moléculas (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-15, IL-22, GM-CSF, VEGF e IFN $\alpha$ ) em baixas concentrações ( $C < 1$ pg/mL) que não foram detectáveis no LCR de nenhum paciente de nenhum outro grupo. Isso pode ter ocorrido devido a uma limitação de armazenamento do estudo. Apesar de a coleta dos LCR de todos os pacientes ter ocorrido no mesmo período, dezembro de 2018 a dezembro de 2019, as amostras de arbovirose foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  imediatamente após realizado o exame de rotina do serviço. Por sua vez, as amostras de LCR dos pacientes das demais patologias foram armazenadas no serviço em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem resgatadas para a pesquisa entre janeiro de 2020 e julho de 2020, quando foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Foi observado, tanto em infecção viral NA quanto na arbovirose, a presença de IFN $\gamma$ , conhecida citocina produzida na resposta a agente infeccioso viral responsável pela ativação da produção de quimiocinas e da migração de células TCD4 pela BBB (SONAR et al., 2017). Outra similaridade é a diminuição significativa dos níveis de IL-9, IL-7 e IL-17A no LCR dos pacientes. A IL-2 e a RANTES também aparecem diminuídas em ambas infecções virais, porém em não-arbovirose essa diminuição é estatisticamente significativa ( $P=0,0166$  e  $P=0,0012$ , respectivamente) e em arbovirose não ( $P=0,0829$  e  $P=0,0827$ , respectivamente). Essas evidências sugerem que essas moléculas estão envolvidas na resposta viral não específica no SNC.

Por sua vez, os níveis de IP-10 estão aumentados próximo à significância ( $P=0,052$ ) no LCR dos pacientes com arbovirose quando comparado à cefaleia. Essa quimiocina está associada à infiltração de células T e ao rompimento da BBB em



infecções virais (LIND; ERIKSSON; GRAHN, 2019. SKINNER; MARRO; LANE, 2019). Em um estudo prévio com pacientes com doença neurológica causada por arbovirus do mesmo grupo de pesquisa, foi observado que os níveis de IP-10 significativamente maiores no soro dos pacientes na fase aguda da infecção por arbovirose com manifestações neurológicas (ALMEIDA et al., 2021), sugerindo um papel importante desta quimiocina no comprometimento neurológico desses pacientes.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o aumento da celularidade e dos níveis de proteína no LCR está associado à presença de doença neurológica infecciosa (bacteriana, parasitária e virais). O aumento da celularidade, mas não dos níveis de proteína, também está associado à doença autoimune EM, que é imunomediada.

As enxaquecas apresentam aumento de sHLA-G proporcional à gravidade da doença, além de aumento dos níveis de quimiocinas IL-8, MIG, IP-10 e de IL-9 na forma mais grave da doença, sugerindo maior complexidade das correlações recíprocas das moléculas imunes solúveis para controle da inflamação com uma forte correlação positiva entre TNF, IL-2, IL-7 e IL-17A e também RANTES e MIP-1a.

A EM é caracterizada pela presença de moléculas inflamatórias e quimiocinas responsáveis pelo tráfego de células T, enquanto que a doença autoimune ELA há uma redução das moléculas inflamatórias e dessas quimiocinas, confirmando a etiologia neurodegenerativa, não inflamatória, da doença. Em ambas, há uma diminuição da molécula MCP-1, conhecido critério de gravidade da doença.

Nas doenças neurológicas infecciosas, o perfil de moléculas no LCR e a força de correlação entre elas vai variar de acordo com o agente etiológico. Na infecção bacteriana e parasitárias as quimiocinas exercem um importante papel na resposta imune no SNC. Entretanto, na infecção bacteriana o IL-17A desempenha um papel importante na resposta imune. Na infecção viral há uma resposta não específica padrão, sendo os níveis de IP-10, MCP-1 e HLA-G a principal diferença entre a resposta imune a infecção causada por arbovirose e não arbovirose.

Por fim, esse estudo servirá como padrão de referência para futuras pesquisas sobre a resposta imune no sistema nervoso central.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H.; PILLAI, SHIV. *Imunologia Celular e Molecular*. 8. ed. Amsterdã: Elsevier, 2015.

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny; MONSALVE, Diana M.; RAMÍREZ-SANTANA, Carolina. Identifying the culprits in neurological autoimmune diseases. **Journal Of Translational Autoimmunity**, [s. l.], v. 2, p. 100015, dez. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtauto.2019.100015>.

AKANUMA, Shin-Ichi *et al.*. Attenuation of prostaglandin E2 elimination across the mouse blood-brain barrier in lipopolysaccharide-induced inflammation and additive inhibitory effect of cefmetazole. **Fluids And Barriers of The Cns**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 24, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/2045-8118-8-24>.

ALMEIDA, Renata Santos *et al.* Cytokines and Soluble HLA-G Levels in the Acute and Recovery Phases of Arbovirus-Infected Brazilian Patients Exhibiting Neurological Complications. **Frontiers In Immunology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 582935, 12 mar. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2021.582935>.

BARICHELLO, Tatiana *et al.* Pathophysiology of Bacterial Infection of the Central Nervous System and its Putative Role in the Pathogenesis of Behavioral Changes. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 1, p. 81-87, fev. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbp.2012.11.003>.

CARDONA, Astrid E.; GONZALEZ, Paula A.; TEALE, Judy M. CC Chemokines Mediate Leukocyte Trafficking into the Central Nervous System during Murine Neurocysticercosis: role of  $\gamma\delta$  t cells in amplification of the host immune response. **Infection And Immunity**, Washington, DC, v. 71, n. 5, p. 2634-2642, May 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/iai.71.5.2634-2642.2003>.

CARDOSO, Filipa Lourenço; BRITES, Dora; BRITO, Maria Alexandra. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. **Brain Research Reviews**, Amsterdã, v. 64, n. 2, p. 328-363, Sept. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.05.003>.

CARDOSO, Filipa L. *et al.* Exposure to Lipopolysaccharide and/or Unconjugated Bilirubin Impair the Integrity and Function of Brain Microvascular Endothelial Cells. **Plos One**, São Francisco, v. 7, n. 5, p. e35919, 7 maio 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035919>

CARTER, Sally L. *et al.* Induction of the genes for Cxcl9 and Cxcl10 is dependent on IFN- $\gamma$  but shows differential cellular expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and by astrocytes and microglia in vitro. **Glia**, Nova York, v. 55, n. 16, p. 1728-1739, 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.20587>.

CHERIAN, Ajith *et al.* Neurotuberculosis: an update. **Acta Neurologica Belgica**, Bruxelas, v. 121, n. 1, p. 11-21, 5 jan. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13760-020-01575-0>.

CHUI, Ray; DOROVINI-ZIS, Katerina. Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. **Journal Of Neuroinflammation**, Londres, v. 7, n. 1, p. 1, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-1>.

CSERR, H F. Physiology of the choroid plexus. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 51, n. 2, p.273-311, abr. 1971. DOI: <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1971.51.2.273>.

DAGINAWALA, Hatimf *et al.*. Neurological complications of Chikungunya virus infection. **Neurology India**, Mumbai, v. 57, n. 2, p. 177, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4103/0028-3886.51289>.

DAHM, Tobias *et al.*. Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. **Mediators Of Inflammation**, Nova York, v. 2016, p. 1-16, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8562805>.

DANDO, Samantha J. *et al.*. Pathogens Penetrating the Central Nervous System: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 4, p. 691-726, out. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00118-13>.

DISDIER, Clémence; STONESTREET, Barbara S.. Blood–Brain Barrier. **Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology**, [s. l.], p.325-336, 2019. Elsevier. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-813146-6.00024-2>.

DOLL, Bradley B. *et al.*. Model-based choices involve prospective neural activity. **Nature Neuroscience**, Nova York, v. 18, n. 5, p. 767-772, 23 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3981>

FELDMAN, L. T. *et al.*. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, Washington, v. 99, n. 2, p. 978-983, 2 jan. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.022301899>.

GALETTA, Kristin M.; BHATTACHARYYA, Shamik. Multiple Sclerosis and Autoimmune Neurology of the Central Nervous System. **Medical Clinics Of North America**, Filadelfia, v. 103, n. 2, p.325-336, mar. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.004>.

GRANDGIRARD, Denis *et al.*. The Causative Pathogen Determines the Inflammatory Profile in Cerebrospinal Fluid and Outcome in Patients with Bacterial Meningitis. **Mediators Of Inflammation**, Nova York, v. 2013, p. 1-12, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/312476>.

HACOHEN, Yael *et al.*. CSF albumin and immunoglobulin analyses in childhood neurologic disorders. **Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.e10, 15 maio 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1212/nxi.000000000000010>.

HAN, Dan *et al.*. Clematichinenoside protects blood brain barrier against ischemic stroke superimposed on systemic inflammatory challenges through up-regulating A20. **Brain, Behavior, And Immunity**, São Diego, v. 51, p. 56-69, jan. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.025>

HAUSER, Stephen L. *et al.*. B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. **New England Journal Of Medicine**, Boston, v. 358, n. 7, p. 676-688, 14 fev. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa0706383>.

HUANG, Ying-Ying *et al.*. Neuroimmune crosstalk in central nervous system injury-induced infection and pharmacological intervention. **Brain Research Bulletin**, Fenix, v. 153, p. 232-238, nov. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2019.09.003>.

HUANG, Yu-Hwa *et al.*. Janus head: the dual role of hla-g in cns immunity. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Basel, v. 68, n. 3, p. 407-416, 18 nov. 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0582-5>.

HUANG, Zhi; MEOLA, Danielle; PETITTO, John M.. Loss of CNS IL-2 gene expression modifies brain T lymphocyte trafficking: response of normal versus autoreactive treg-deficient t cells. **Neuroscience Letters**, Amisterdã, v. 499, n. 3, p. 213-218, jul. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2011.05.230>.

INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. **Cephalalgia**, Oslo, v. 38, n. 1, p. 1-211, jan. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0333102417738202>.

IORIO, Raffaele; O'TOOLE, Orna; PITTOCK, Sean J.. Autoimmune and Paraneoplastic Neurological Disorders. **Neurobiology Of Brain Disorders**, [s.l.], p. 467-496, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-398270-4.00029-x>.

JOHNSON, Aaron J. *et al.*. The CD8 T Cell in Multiple Sclerosis: suppressor cell or mediator of neuropathology?. **International Review Of Neurobiology**, Nova York, p. 73-97, 2007. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7742\(07\)79004-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0074-7742(07)79004-9).

KAM, Yiu-Wing *et al.*. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 216, n. 2, p. 172-181, 30 maio 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix261>.

KARAHASHI, Hisae; MICHELSEN, Kathrin S.; ARDITI, Moshe. Lipopolysaccharide-Induced Apoptosis in Transformed Bovine Brain Endothelial Cells and Human Dermal Microvessel Endothelial Cells: The Role of JNK. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 182, n. 11, p.7280-7286, 19 maio 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0801376>.

KLEIN, Robyn S. *et al.*. IFN-Inducible Protein 10/CXC Chemokine Ligand 10-Independent Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **The Journal**

**Of Immunology**, [s.l.], v. 172, n. 1, p. 550-559, 19 dez. 2003.. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.550>

KOTHUR, Kavitha *et al.*. CSF cytokines/chemokines as biomarkers in neuroinflammatory CNS disorders: A systematic review. **Cytokine**, São Diego, v. 77, p.227-237, jan. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.10.001>.

KOYUNCU, Orkide O.; HOGUE, Ian B.; ENQUIST, Lynn W.. Virus Infections in the Nervous System. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 379-393, abr. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.03.010>.

LANCASTER, Eric; DALMAU, Josep. Neuronal autoantigens—pathogenesis, associated disorders and antibody testing. **Nature Reviews Neurology**, [s.l.], v. 8, n. 7, p.380-390, 19 jun. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.99>

LEIB, Stephen I. *et al.* Inducible Nitric Oxide Synthase and the Effect of Aminoguanidine in Experimental Neonatal Meningitis. **The Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 177, n. 3, p.692-700, mar. 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/514226>.

LEIB, S. L..Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. **Brain**, Londres, v. 124, n. 9, p. 1734-1742, 1 set. 2001. Oxford University Press (OUP). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/brain/124.9.1734>.

LI, Hong *et al.*. Regulation of T helper cell subsets by cyclooxygenases and their metabolites. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, Los Altos, v. 104-105, p. 74-83, jul. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.11.002>.

LIN, Jian-Xin; LEONARD, Warren J.. The Common Cytokine Receptor  $\gamma$  Chain Family of Cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, [s.l.], v. 10, n. 9, p. a028449, 16 out. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a028449>.

LIND, Liza; ERIKSSON, Kristina; GRAHN, Anna. Chemokines and matrix metalloproteinases in cerebrospinal fluid of patients with central nervous system complications caused by varicella-zoster virus. **Journal Of Neuroinflammation**, Londres, v. 16, n. 1, p. 42, 18 fev. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-019-1428-1>.

LIND, Liza *et al.*. CXCL11 production in cerebrospinal fluid distinguishes herpes simplex meningitis from herpes simplex encephalitis. **Journal Of Neuroinflammation**, Londres, v. 14, n. 1, p. 1, 10 jul. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-0907-5>.

LOPEZ-RAMIREZ, Miguel Alejandro *et al.* MicroRNA-155 negatively affects blood–brain barrier function during neuroinflammation. **The FASEB Journal**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.2551-2565, 6 mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-248880>.

MANSUY, Jean-Michel *et al.*. Peripheral Plasma and Semen Cytokine Response to Zika Virus in Humans. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 25, n. 4, p. 823-825, abr. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2504.171886>.

MARRA, Christina M.. Neurosyphilis. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, Nova York, v. 21, p. 1714-1728, dez. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1212/con.0000000000000250>.

MATSUSHITA, Takuya *et al.*. Characteristic Cerebrospinal Fluid Cytokine/Chemokine Profiles in Neuromyelitis Optica, Relapsing Remitting or Primary Progressive Multiple Sclerosis. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 4, p. 61835, 18 abr. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061835>.

MCCOY, Melissa K; TANSEY, Malú G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **Journal Of Neuroinflammation**, Londres, v. 5, n. 1, p. 45, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-5-45>.

MESTRE, Humberto *et al.*. Flow of cerebrospinal fluid is driven by arterial pulsations and is reduced in hypertension. **Nature Communications**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-9, 19 nov. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07318-3>.

MILHORAT, T. H. *et al.*. Cerebrospinal Fluid Production by the Choroid Plexus and Brain. **Science**, Washington, v. 173, n. 3994, p. 330-332, 23 jul. 1971. DOI: <http://dx.doi.org/10.1126/science.173.3994.330>.

MOCIORNITA, Amelia G. *et al.*. Effects of everolimus and HLA-G on cellular proliferation and neutrophil adhesion in an in vitro model of cardiac allograft vasculopathy. **American Journal Of Transplantation**, Copenhagen, v. 18, n. 12, p. 3038-3044, 13 ago. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.15015>.

MORANDI, Fabio *et al.*. Human Amnion Epithelial Cells Impair T Cell Proliferation: the role of hla-g and hla-e molecules. **Cells**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. 2123, 19 set. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9092123>.

MOTT, K. R. *et al.*. Role of Interleukin-2 and Herpes Simplex Virus 1 in Central Nervous System Demyelination in Mice. **Journal Of Virology**, Washington, v. 87, n. 22, p. 12102-12109, 28 ago. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.02241-13>.

NARUMI, Shosaku *et al.*. Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. **European Journal Of Immunology**, Weinheim, v. 32, n. 6, p. 1784, jun. 2002. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200206\)32:63.0.co;2-r](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:63.0.co;2-r).

NETTER, Frank H. Atlas de Anatomia Humana. 2. ed. Porto Alegre. 2000.

NURATA, Hakan *et al.*. The role of fibroblast growth factor-2 in healing the dura mater after inducing cerebrospinal fluid leakage in rats. **Journal Of Clinical Neuroscience**, Melbourne, v. 16, n. 4, p. 542-544, abr. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2008.05.021>.

O'CONNOR, Kevin C. *et al.*. Antibodies from Inflamed Central Nervous System Tissue Recognize Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 175, n. 3, p. 1974-1982, 20 jul. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.3.1974>.

PARASHAR, Ashish Kumar; NEMA, Rajesh Kumar. A REVIEW ON NOVEL TECHNIQUES FOR DRUG DELIVERY TO THE BRAIN. **Current Research In Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.134-141, out. 2012.

OH, Seung-Hun *et al.*. Interleukin-1 receptor antagonist-mediated neuroprotection by umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells following transplantation into a rodent stroke model. **Experimental & Molecular Medicine**, Seul, v. 50, n. 4, p. 1-12, abr. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0041-1>.

PASTUSZCZAK, Maciej *et al.*. Elevated Cerebrospinal Fluid Interleukin-17A and Interferon- $\gamma$  Levels in Early Asymptomatic Neurosyphilis. **Sexually Transmitted Diseases**, Filadelfia, v. 40, n. 10, p. 808-812, out. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/olq.0000000000000024>.

PIEPER, Christian; PIELOCH, Paulina; GALLA, Hans-joachim. Pericytes support neutrophil transmigration via interleukin-8 across a porcine co-culture model of the blood-brain barrier. **Brain Research**, Amsterdã, v. 1524, p.1-11, ago. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.05.047>.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. Immunomodulatory Strategies in Herpes Simplex Virus Encephalitis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 33, n. 2, p. 1, 12 fev. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00105-19>.

PROBERT, L.. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. **Neuroscience**, Oxford, v. 302, p. 2-22, ago. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.

PONCHEL, Frederique; CUTHBERT, Richard J.; GOËB, Vincent. IL-7 and lymphopenia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdã, v. 412, n. 1-2, p. 7-16, jan. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.002>.

QIN, Lan-Hui *et al.*. LPS Induces Occludin Dysregulation in Cerebral Microvascular Endothelial Cells via MAPK Signaling and Augmenting MMP-2 Levels. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2015, p. 1-9, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/120641>.

ROJAS-ZULETA, Wilmer Gerardo; SANCHEZ, Elizabeth. IL-9: function, sources, and detection. **Methods In Molecular Biology**, Nova York, p. 21-35, 2017. DOI: [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0_2).

ROSENBERG, G.a.. Cerebrospinal Fluid. **Primer On Cerebrovascular Diseases**, [s.l.], p.25-31, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803058-5.00004-7>.



SADISSOU, Ibrahim et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. **Malaria Journal**, Londres, v. 13, n. 1, p.312-319, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-312>.

SHABAB, Tara *et al.*. Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal Of Neuroscience**, Nova York, v. 127, n. 7, p. 624-633, 9 ago. 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>.

SHARMA, Kanika *et al.*. Blood-Brain Barrier Disruption During Neuroinflammation. **Neuroinflammation**, [s.l.], p. 529-539, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811709-5.00030-2>.

SHASTRI, Abhishek; BONIFATI, Domenico Marco; KISHORE, Uday. Innate Immunity and Neuroinflammation. **Mediators Of Inflammation**, Nova York, v. 2013, p.1-19, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/342931>.

SHIVKUMAR, M. *et al.*. Herpes Simplex Virus 1 Targets the Murine Olfactory Neuroepithelium for Host Entry. **Journal Of Virology**, Washington, v. 87, n. 19, p. 10477-10488, 31 jul. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.01748-13>.

SKELLY, Donal T. *et al.*. A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF- $\alpha$  and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 7, p. e69123, 1 jul. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069123>.

SKINNER, Dominic; MARRO, Brett S.; LANE, Thomas E.. Chemokine CXCL10 and Coronavirus-Induced Neurologic Disease. **Viral Immunology**, Nova York, v. 32, n. 1, p. 25-37, fev. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/vim.2018.0073>.

SONAR, Sandip Ashok *et al.*. IFN- $\gamma$  promotes transendothelial migration of CD4 + T cells across the blood–brain barrier. **Immunology & Cell Biology**, Adelaide, v. 95, n. 9, p. 843-853, ago. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2017.56>.

SUN, Lin *et al.*. E.. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of cns autoimmune disease. **Cytokine**, São Diego, v. 75, n. 2, p. 249-255, out. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.030>.

TOBIN, W. Oliver et al. Autoimmune Neurology of the Central Nervous System. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.627-653, jun. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1212/con.0000000000000487>.

TZARTOS, John S. *et al.*. Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. **The American Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 172, n. 1, p. 146-155, jan. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2008.070690>.

UBOGU, Eroboghene E. *et al.*. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood–brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. **Journal Of Neuroimmunology**, Amsterdã, v. 179, n. 1-2, p. 132-144, out. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.004>.

UDDIN, Jasim *et al.*. Monocyte-Astrocyte Networks and the Regulation of Chemokine Secretion in Neurocysticercosis. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 175, n. 5, p. 3273-3281, 22 ago. 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3273>.

URAYAMA, Akihiko *et al.*. Pharmacologic manipulation of lysosomal enzyme transport across the blood-brain barrier. **Journal Of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, Nova York, v. 36, n. 3, p. 476-486, 3 nov. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/0271678x15614589>

VARATHARAJ, Aravinthan; GALEA, Ian. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain, Behavior, And Immunity**, São Diego, v. 60, p.1-12, fev. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>.

WAISMAN, Ari; HAUPTMANN, Judith; REGEN, Tommy. The role of IL-17 in CNS diseases. **Acta Neuropathologica**, Berlim, v. 129, n. 5, p. 625-637, 26 fev. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1402-7>.

WATSON, Adrienne Eve Scovil *et al.*. Regulation of CNS precursor function by neuronal chemokines. **Neuroscience Letters**, Amsterdã, v. 715, p. 134533, jan. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134533>.

WEN, Shi-Rong *et al.*. Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. **Journal Of Neuroimmunology**, Amsterdã, v. 244, n. 1-2, p. 94-96, mar. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2011.12.004>.

WEST, Phillip K. *et al.*. Microglia responses to interleukin-6 and type I interferons in neuroinflammatory disease. **Glia**, Nova York, v. 67, n. 1, p. 1821-1841, 29 abr. 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23634>.

WHITLEY, Richard J.. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. **Antiviral Research**, Amsterdã, v. 71, n. 2-3, p. 141-148, set. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.002>.

WITTMANN, Gábor *et al.*. Parallel Regulation of Thyroid Hormone Transporters OATP1c1 and MCT8 During and After Endotoxemia at the Blood-Brain Barrier of Male Rodents. **Endocrinology**, Baltimore, v. 156, n. 4, p. 1552-1564, 1 abr. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2014-1830>.

WRIGHT, Ben L. C.; LAI, James T. F.; SINCLAIR, Alexandra J.. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. **Journal Of Neurology**, Berlim, v. 259, n. 8, p.1530-1545, 26 jan. 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-012-6413-x>.

WU, Kuo-Chen *et al.*. Effects of lipopolysaccharide on the expression of plasma membrane monoamine transporter (PMAT) at the blood-brain barrier and its implications to the transport of neurotoxins. **Journal Of Neurochemistry**, Oxford, v. 135, n. 6, p. 1178-1188, 14 out. 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13363>.

YAN, Yongxing *et al.*. CXCL13 and TH1/Th2 cytokines in the serum and cerebrospinal fluid of neurosyphilis patients. **Medicine**, [s.l.], v. 96, n. 47, p. 8850, nov. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/md.00000000000008850>.

YANG, Qiao-Qiao *et al.*. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells. **Glia**, Nova York, v. 67, n. 6, p. 1017-1035, 11 dez. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.23571>.

ZHOU, Yan *et al.*. IL-9 Promotes Th17 Cell Migration into the Central Nervous System via CC Chemokine Ligand-20 Produced by Astrocytes. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 186, n. 7, p. 4415-4421, 23 fev. 2011.. DOI: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1003307>.

ZIMMERMANN, Julian *et al.*. CNS-Targeted Production of IL-17A Induces Glial Activation, Microvascular Pathology and Enhances the Neuroinflammatory Response to Systemic Endotoxemia. **Plos One**, São Francisco, v. 8, n. 2, p. 57307, 27 fev. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057307>.

ZLOTNIK, Albert; YOSHIE, Osamu. The Chemokine Superfamily Revisited. **Immunity**, Cambridge, v. 36, n. 5, p.705-716, maio 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.008>.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador Responsável: Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva  
Endereço: Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade  
Universitária CEP: 50.670-420 - Recife/PE.  
Fone: (81) 2101-2618 ou (81) 99962-3975.  
E-mail: nlucena@cpqam.fiocruz.br

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “Estudo do polimorfismo da região promotora e da expressão do HLA-G em pacientes portadores de esclerose múltipla em uso de interferon- $\beta$ ”. Nesta pesquisa pretendemos estudar a esclerose múltipla, tendo como objetivo a identificação de fatores existentes nos genes e proteínas que possam estar relacionados à resposta ao tratamento. O motivo que nos leva a estudar os genes e a imunidade (defesa do organismo) de pessoas com esclerose múltipla é que essas características contribuem no desenvolvimento da inflamação crônica do Sistema Nervoso Central e pode ajudar na identificação de marcadores que podem contribuir para a criação de medidas de tratamento precoce, antes do estabelecimento de lesões graves.

Para este estudo será necessário que o senhor(a) autorize o uso das informações sobre a doença e condições de vida contidas no prontuário médico e banco de dados do hospital, além do uso e armazenamento de amostras de sangue já coletados nos exames de rotina do Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração e a autorização para utilização do líquido da coluna (líquido cefalorraquidiano) colhido no diagnóstico e armazenado no laboratório clínico.

O principal desconforto relacionado ao estudo é a picada da agulha durante a punção de um vaso periférico (veias dos braços ou mãos) quando será coletado 10 ml (2 colheres de chá). A retirada de sangue pode causar uma pequena mancha roxa e dolorida na pele (hematoma) que pode ser tratada com uma compressa fria. Informamos que para esse estudo não será necessária nenhuma outra coleta de amostra, só usaremos o excedente de amostra de sangue colhido no “dia de procedimento” em uma de suas visitas ao hospital. Da mesma forma, a amostra do líquido da coluna será aquela colhida no diagnóstico e que fica armazenada no laboratório por algumas semanas, com a sua autorização nós iremos contactar esse laboratório para ter acesso a essa amostra, nenhuma outra amostra do líquido da coluna será coletada para esse projeto. Esclarecemos que os resultados desse estudo serão repassados ao seu médico, mas poderão não beneficiá-lo (a) diretamente. Entretanto, o estudo poderá trazer contribuições para outros pacientes que vierem apresentar a esclerose múltipla, pois ajudará a melhorar o tratamento e a entender as causas da doença.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa

resultar deste estudo, permanecendo sua identidade em sigilo, evitando quaisquer possíveis constrangimentos que a sua participação venha causar-lhe.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma via será arquivada pelo pesquisador responsável, no Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz e a outra será fornecida a você. Ambas as vias devem estar assinadas ao fim e ter todas as páginas rubricadas.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deste centro de pesquisas, localizado na Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária, Recife/PE, CEP: 50.670-420, através do telefone (81) 2101-2639 ou pelo e-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br. O horário de funcionamento é das 08:00 – 12:00 h / 13:00 – 15h. O CEP é responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

Sendo assim, eu, \_\_\_\_\_  
na condição de responsável, fui informado (a) dos objetivos do estudo “Estudo do polimorfismo da região promotora e da expressão do HLA-G em pacientes portadores de esclerose múltipla em uso de interferon- $\beta$ ”, de maneira clara e detalhada e esclarecida minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas. E autorizo também a utilização das amostras citadas neste documento:

- ( ) com a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE;  
( ) dispenso a necessidade de um novo contato e assinatura de um novo TCLE.

Recife, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL

Endereço do participante para contato futuro.

Rua \_\_\_\_\_ No. \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA 1° TESTEMUNHA ASSINATURA

\_\_\_\_\_  
PESQUISADOR RESPONSÁVEL

## APÊNDICE B – TABELA DAS CONCENTRAÇÕES DE MOLÉCULAS SOLÚVEIS NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO E SUAS SIGNIFICÂNCIAS ESTATÍSTICAS

pg/mL	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infecção Parasitária	Infecção Bacteriana	Infecção Viral Não-Arbovirose	Infecção Viral Arbovirose	P(K-W)
<b>Amostras (n)</b>	10	13,00	28,00	7,00	5,00	8,00	4,00	22,00	5,00	
<b>FGF-basic</b>										0,0149
Máxima	21,92	24,05	22,23	26,03	22,53	23,29	19,49	26,94	23,48	
Mínima	17,97	16,14	11,28	17,06	17,06	17,36	16,45	13,25	0,0	
Média	19,37	18,61	18,63	19,99	18,82	18,83	17,97	17,81	4,696	
Desvio padrão	1,322	1,878	2,425	2,879	2,132	2,229	1,337	2,534	10,50	
Mediana	19,19	18,27	18,88	19,64	18,27	17,97	17,97	17,14	0,0	
<b>P (M-W)</b>		0,1006	0,5823	0,8737	0,3141	0,0996	0,1891	0,0102	0,0827	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>										< 0,0001
Máxima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,78	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0200	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,584	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,0	5,700	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0400	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>G-CSF</b>										< 0,0001
Máxima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	81,84	
Mínima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,60	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,48	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	78,07	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-10</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,61	
Mínima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0100	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,732	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,79	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0100	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-13</b>										0,0149
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	42,49	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,498	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,00	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	N	n	

pg/mL	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infecção Parasitária	Infecção Bacteriana	Infecção Viral Não-Arbovirose	Infecção Viral Arbovirose	P(K-W)
<b>IL-6</b>										0,0008
Máxima	181,3	13,90	18,98	0,0	0,0	304,6	0,0	4891,00	49,84	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0300	
Média	23,11	1,069	0,8586	0,0	0,0	78,63	0,0	266,7	10,10	
Desvio padrão	59,64	3,855	3,678	0,0	0,0	128,6	0,0	1040,00	22,21	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2100	
<b>P (M-W)</b>		0,1366	0,0460	n	n	0,6124	n	0,9784	0,2117	
<b>IL-12</b>										0,3273
Máxima	2,460	2,460	1,310	9,390	3,230	7,850	20,17	64,82	22,53	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,1643	0,1643	0,1008	2,266	0,6460	0,9813	5,043	3,275	4,518	
Desvio padrão	0,5104	0,5104	0,3633	3,823	1,445	2,775	10,09	13,82	10,07	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,2700	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0300	
<b>P (M-W)</b>		0,9902	0,4520	0,1100	0,7938	0,8604	0,6156	0,8065	0,0768	
<b>Rantes</b>										0,0037
Máxima	21,02	22,03	22,44	20,48	19,23	20,31	17,74	19,43	52,15	
Mínima	13,59	14,33	12,27	13,52	14,20	13,79	3,390	3,390	0,0	
Média	17,97	16,58	17,18	16,40	16,56	17,56	13,19	13,70	15,47	
Desvio padrão	2,198	2,214	2,546	2,962	2,017	2,140	6,717	3,654	21,05	
Mediana	17,98	15,88	16,93	16,66	16,97	18,25	15,82	14,89	10,42	
<b>P (M-W)</b>		0,1089	0,2963	0,3404	0,3485	0,8096	0,1891	0,0012	0,0827	
<b>Eotaxim</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	122,6	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,610	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	54,01	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	43,21	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	54,13	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-17A</b>										< 0,0001
Máxima	34,23	31,67	34,47	34,71	32,28	31,79	28,14	36,18	19,30	
Mínima	27,90	22,30	26,92	26,19	26,68	27,90	18,40	24,00	0,0	
Média	30,36	28,68	29,80	29,29	28,33	29,46	25,04	27,63	3,862	
Desvio padrão	1,767	2,358	1,613	2,828	2,241	1,341	4,469	2,508	8,630	
Mediana	30,09	28,87	29,84	29,30	27,65	29,66	26,80	27,59	0,0	
<b>P (M-W)</b>		0,1084	0,4675	0,3404	0,0617	0,4117	0,0108	0,0011	0,0033	
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>										0,3941
Máxima	60,37	62,14	65,68	66,78	58,60	76,29	56,16	70,10	117,7	
Mínima	44,44	45,33	18,34	44,44	48,42	49,53	45,11	34,93	31,57	
Média	53,78	51,81	52,56	54,33	53,20	57,46	50,52	50,61	71,03	
Desvio padrão	4,944	4,825	9,123	7,924	4,592	8,386	4,797	8,372	32,88	
Mediana	53,29	51,08	52,52	54,40	52,40	56,17	50,41	51,74	58,83	

pg/mL	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infecção Parasitária	Infecção Bacteriana	Infecção Viral Não-Arbovirose	Infecção Viral Arbovirose	P(K-W)
<b>P (M-W)</b>		0,3005	0,8316	0,9578	0,6404	0,5003	0,3539	0,2959	0,2398	
<b>GM-CSF</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,84	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,184	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7,075	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0400	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	N	n	
<b>MIP-1β</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	3,630	0,0	0,0	140,3	0,0	0,8400	98,46	
Mínima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,96	
Média	0,0	0,0	0,1296	0,0	0,0	17,53	0,0	0,03818	43,65	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,6860	0,0	0,0	49,59	0,0	0,1791	35,18	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	19,96	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	N	n	
<b>MCP-1</b>										< 0,0001
Máxima	942,1	505,6	1130,00	143,5	113,3	93,51	176,5	1504,00	2265,00	
Mínima	98,78	79,03	77,05	79,03	73,76	73,76	69,81	55,33	183,6	
Média	353,6	186,8	261,7	98,40	86,93	83,64	104,7	165,8	1147,00	
Desvio padrão	292,9	139,2	253,5	23,60	17,39	8,116	49,76	304,5	880,6	
Mediana	239,7	125,8	184,0	102,1	77,71	83,64	86,27	80,34	1151,00	
<b>P (M-W)</b>		0,1418	0,3482	0,0095	0,0070	< 0,0001	0,0503	0,0014	0,0829	
<b>IL-15</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	116,0	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0400	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23,25	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	51,85	
Mediana	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0700	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>EGF</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	167,6	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	83,80	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	125,9	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,36	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	111,7	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-5</b>										0,0149
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	11,68	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,336	





pg/mL	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infecção Parasitária	Infecção Bacteriana	Infecção Viral Não-Arbovirose	Infecção Viral Arbovirose	P(K-W)
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	53,19	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0100	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,65	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23,78	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0100	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-9</b>										< 0,0001
Máxima	6,610	4,870	6,090	7,310	5,220	4,290	2,660	3,240	5,970	
Mínima	2,420	2,310	1,440	1,730	1,380	1,730	1,260	0,0	0,0100	
Média	4,047	3,191	3,884	3,123	2,544	2,579	1,655	1,793	1,202	
Desvio padrão	1,548	0,8143	1,067	1,945	1,537	0,9146	0,6754	0,9829	2,665	
Mediana	3,240	3,010	3,875	2,830	2,080	2,225	1,350	1,870	0,0100	
<b>P (M-W)</b>		0,1318	0,9154	0,1676	0,0327	0,0267	0,0108	0,0003	0,0453	
<b>IL-1RA</b>										0,4163
Máxima	25,71	23,61	28,90	25,88	27,05	103,0	19,58	197,4	28,28	
Mínima	19,33	18,82	18,82	18,82	18,65	18,49	18,65	17,48	11,11	
Média	21,19	20,15	21,53	20,90	21,24	31,71	19,05	35,06	19,18	
Desvio padrão	2,023	1,342	2,587	2,280	3,587	29,07	0,3865	41,02	6,376	
Mediana	21,01	20,00	20,59	20,46	19,49	20,17	18,99	20,30	20,39	
<b>P (M-W)</b>		0,1414	0,8872	0,6715	0,5918	0,8847	0,0249	0,7771	0,5040	
<b>TNF<math>\alpha</math></b>										0,0109
Máxima	30,54	27,07	29,15	35,39	22,91	22,22	15,28	24,30	23,34	
Mínima	13,55	11,81	9,040	11,81	9,040	11,81	2,100	6,610	0,0100	
Média	17,36	15,63	16,68	17,46	14,03	15,15	9,733	13,36	4,676	
Desvio padrão	5,233	4,911	4,328	8,209	5,313	3,327	5,521	4,237	10,43	
Mediana	15,97	13,20	15,97	15,28	13,20	14,59	10,78	12,51	0,0100	
<b>P (M-W)</b>		0,0739	0,8730	0,4898	0,0817	0,2625	0,0362	0,0206	0,0608	
<b>IL-3</b>										< 0,0001
Máxima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	39,68	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,530	
Média	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	23,85	
Desvio padrão	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,68	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25,69	
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-2</b>										0,0169
Máxima	12,62	11,99	10,73	21,47	12,62	6,300	10,09	8,830	38,61	
Mínima	0,6200	0,0	0,0	1,250	0,0	1,250	0,6200	0,0	0,0200	
Média	4,514	3,268	3,979	6,124	4,156	3,221	2,988	1,644	7,748	
Desvio padrão	4,052	3,566	2,770	6,977	4,883	1,710	4,735	2,422	17,25	
Mediana	3,780	2,510	3,615	5,040	2,510	2,825	0,6200	0,3100	0,0400	
<b>P (M-W)</b>		0,4222	0,9435	0,6326	0,8413	0,9231	0,2107	0,0166	0,0829	



pg/mL	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada	Esclerose Múltipla	ELA	Infeção Parasitária	Infeção Bacteriana	Infeção Viral Não-Arbovirose	Infeção Viral Arbovirose	P(K-W)
<b>P (M-W)</b>		n	n	n	n	n	n	n	n	
<b>IL-8</b>										0,0073
Máxima	98,98	123,4	1667,00	0,0	0,0	488,7	0,0	2074,00	350,0	
Mínima	0,00	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1600	
Média	17,10	11,96	72,09	0,0	0,0	116,4	0,0	192,0	70,53	
Desvio padrão	33,14	34,20	317,2	0,0	0,0	198,3	0,0	462,6	156,2	
Mediana	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9600	
<b>P (M-W)</b>		0,6097	0,1767	n	n	0,6124	n	0,5585	0,1652	
<b>Amostras (n)</b>	9,00	22,00	39,00	12,00	5,00	7,00	12,00	30,00	5,00	
<b>HLA-G ng/mL</b>										0,0089
Máxima	3,327	5,484	11,88	11,65	1,386	68,94	12,80	38,02	4,318	
Mínima	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
Média	0,4820	1,982	2,608	3,858	0,5622	13,60	3,411	4,343	0,8636	
Desvio padrão	1,118	1,590	2,326	3,365	0,6040	25,67	4,700	7,729	1,931	
Mediana	0,0	1,896	2,117	3,809	0,4850	1,086	1,687	1,718	0,0	
<b>P (M-W)</b>		0,0029	0,0009	0,0021	0,3512	0,0620	0,0832	0,0086	1,0000	

## APÊNDICE C – ARTIGO

### A Molécula HLA-G nas Dores de Cabeça Primárias

Katherine Aquino Matias<sup>1</sup>, Maria Lúcia Brito Ferreira<sup>2</sup>, Flavia Flacão<sup>2</sup>, Eduardo Antônio Donadi<sup>3</sup>, Flavia Tremeschin de Almeida Vieira<sup>3</sup>, Isabelle Viana<sup>4</sup>, Álvaro Moreira<sup>2</sup>, Elizabeth Lima Guimarães<sup>5</sup>, Glauco Henrique Willcox<sup>5</sup>, Norma Lucena Licínio Cavalcanti da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Imunogenética, Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Neurologia, Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>5</sup> HLA Diagnóstico, Recife, Pernambuco, Brasil

#### ABSTRACT

The Blood Brain Barrier (BBB) and the cerebrospinal fluid (CSF) are components of the Central Nervous System (CNS), responsible for the selective transport of substances between the peripheral blood and the CNS. Neuroinflammation is characterized by continuous activation of microglia and other cells in the BBB. Identifying the profile of soluble molecules in the CSF can increase the precision of the investigation of neuroinflammatory events. The present study aims to evaluate the profile of soluble immunological molecules present in the CSF of patients with primary headache. The study population consisted of 73 patients with primary headache, headache, migraine without aura and migraine with aura. The quantification of HLA-G was performed by ELISA. Of the 73 participating patients, 68,5 % were women and the average age is 39 years old. NO difference was find on CSF cellularity or protein levels between the primary headache conditions. Migraines show an increase in sHLA-G proportional to the severity of the disease, in addition to increased levels of IL-8, MIG, IP-10 and IL-9 in the migraine with aura, suggesting greater complexity of the reciprocal correlations of soluble immune molecules for inflammation control with a strong positive correlation between TNF, IL-2, IL-7 and IL-17A and also RANTES and MIP-1a.

#### Introdução

A Barreira Hematoencefálica (BBB) é um componente do Sistema Nervoso Central (SNC), responsável pelo transporte seletivo de substâncias através do fluido extracelular no SNC e no sangue periférico (SHARMA; KALAKOTI; NANDA; SUN, 2018). Em nível molecular, há diversas ectoenzimas, receptores e transportadores nas camadas da BBB responsáveis por regular a concentração de moléculas no líquido cefalorraquidiano e a direção do transporte através da barreira (VARATHARAJ; GALEA, 2017). A BBB é influenciada por mediadores inflamatórios sistêmicos e locais, desempenhando um importante papel na resposta imune do SNC. A ativação de vias inflamatórias pode provocar mudanças na barreira que alteram sua seletividade, permitindo a passagem de moléculas e células que não pertencem ao ambiente do

SNC. (ROSENBERG, 2017. VARATHARAJ; GALEA, 2017. SHARMA; KALAKOTI; NANDA; SUN, 2018).

A dor de cabeça primária acontece quando não há estreita relação temporal com outro transtorno conhecido por causar cefaleia e podem ser classificadas como: cefaleia – dor de cabeça frontal ou lateral em ambos os lados, pulsante ou não, sem outros sintomas neurológicos associados; enxaqueca simples (ES) – também conhecida como enxaqueca sem aura, é caracterizado por transtorno de cefaleia recorrente que se manifesta em crises com duração de 4 a 72 horas, com dor de localização unilateral, qualidade pulsátil, intensidade moderada ou grave, agravamento por atividade física de rotina e associação com náusea e/ou fotofobia e fonofobia; Enxaqueca complicada (EC) - também conhecida como enxaqueca com aura, é caracterizada por ataques recorrentes, com duração de minutos, sintomas visuais, sensoriais ou outros sintomas do sistema nervoso central totalmente reversíveis que geralmente se desenvolvem gradualmente e são seguidos por cefaleia (INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY, 2018).

## **Materiais e Métodos**

### **1. Desenho, Área e População de Estudo**

O estudo é do tipo analítico observacional transversal com comparação de grupos, onde os pacientes com dor de cabeça primária foram selecionados aleatoriamente e posteriormente separados em grupos de acordo com o diagnóstico final.

Constituem população de estudo todos os pacientes que, no período de dezembro de 2018 a dezembro de 2019, foram atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração. Os critérios de inclusão incluem: (1) pacientes com diagnóstico final de dor de cabeça primária; (2) ter no mínimo 18 anos completos durante a execução do estudo.

Serão critérios de exclusão: (1) Preenchimento incompleto das informações referentes a identificação do paciente, dados clínicos ou de exames complementares; (2) Descontinuação do acompanhamento ambulatorial; (3) Óbito anterior à realização dos exames complementares; e (4) não ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido, (5) e não ter coletado amostra biológica para estudo.

### **2. Coleta de dados**

Os pacientes que obedeceram aos critérios de inclusão e de exclusão, foram convidados a participar do estudo, após a explicação de seus objetivos, de seus direitos e da obrigatoriedade do pesquisador em obedecer aos requisitos éticos constantes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Para os pacientes que concordaram em participar, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, a autorização para coleta de informação do seu prontuário, e a utilização de amostra de líquido cefalorraquidiano armazenada no serviço. Aqueles com dados incompletos foram excluídos gerando um grupo final de 73 pacientes.

As informações relativas à identificação do paciente e variáveis de estudo foram obtidas do prontuário hospitalar do paciente. Os pacientes foram então agrupados de acordo com a patologia apresentada, sendo determinado os seguintes grupos: 10

pacientes com cefaleia, 24 com enxaqueca simples (ES) e 39 com enxaqueca complicada (EC).

### **3. Determinação dos níveis de HLA-G solúvel no LCR**

A quantificação de HLA-G será realizada por ELISA com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G/9 (Exbio, Praga, República Checa) conforme descrito previamente (SADISSOU et al., 2014).

### **4. Determinação dos níveis de moléculas solúveis no LCR**

A quantificação das moléculas solúveis no líquido cefalorraquidiano dos pacientes foi realizada através de imunoensaio baseado em esferas fluorescentes usando kit multi-plex pré-formado (Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel, Invitrogen™ Thermo Fisher, Viena, Áustria) seguindo o protocolo do fabricante.

### **5. Análise dos dados**

Para as variáveis epidemiológicas do estudo, foram usados os parâmetros da Estatística Descritiva, a saber: distribuição de frequências absolutas e relativas, média, mediana, e desvio padrão. Quando necessário a comparação de médias entre 2 grupos, serão aplicados os testes t de Student (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não paramétricos será baseada no resultado do teste Kolmogorov-Smirnov de normalidade. O coeficiente de Spearman foi usado para identificar as correlações. Para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade será rejeitada, quando possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não exceda 5% ( $p < 0,05$ ).

## **Resultados**

### **1. Perfil Epidemiológico**

Participaram do estudo 73 pacientes, sendo 68,5 % do gênero feminino e com média de idade de 39 anos. Nenhuma diferença foi encontrada entre a média de idade entre os grupos analisados (Cefaleia 39 anos, ES 39 anos e EC 38 anos).

Tabela 1 – Idade dos Pacientes

Colunas	Cefaleia	Enxaqueca simples	Enxaqueca complicada
<b>Amostras (n)</b>	10	24	39
<b>Idade (anos)</b>			
Máxima	58	111	72
Mínima	24	17	17
Média	39,02	39,88	38,38
Desvio padrão	11,46	17,91	16,28
Mediana	37	37,5	34

## 2. Perfil bioquímico e de celularidade

Nenhuma diferença estática significativa foi encontrada entre os grupos analisados quanto a celularidade, concentração de glicose, cloreto e proteínas.



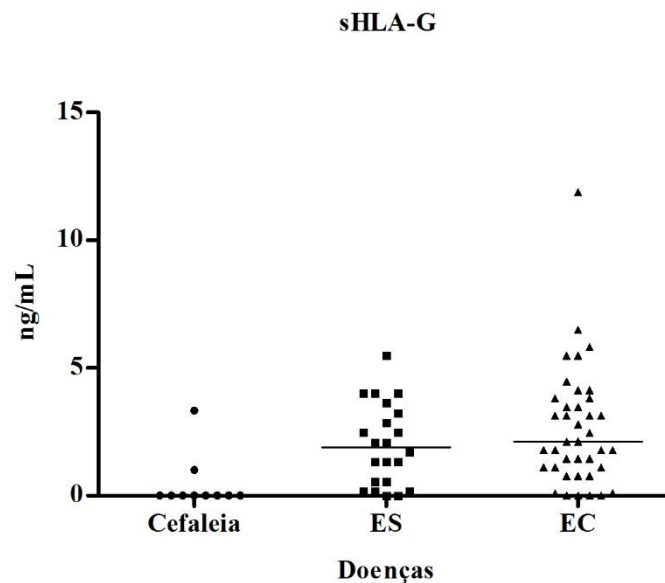
Tabela 2 – Celularidade e Bioquímica do LCR dos pacientes

<b>Colunas</b>	<b>Cefaleia</b>	<b>Enxaqueca simples</b>	<b>Enxaqueca complicada</b>
<b>Amostras (n)</b>	9	24	39
<b>Celularidade (cel./mm<sup>3</sup>)</b>			
Máxima	8	5,66	53,33
Mínima	0	0	0
Média	1,172	1,124	2,908
Desvio padrão	1,936	1,522	8,265
Mediana	0,33	0,66	0,66
<b>Cloreto (mg/ml)</b>			
Máxima	747	737	750
Mínima	663	607	628
Média	704,1	696,2	706,2
Desvio padrão	24,18	33	28,45
Mediana	707	708,5	708
<b>Glicose (mg/ml)</b>			
Máxima	99	112	95
Mínima	57	49	48
Média	73,82	72,88	70,59
Desvio padrão	13,19	17,24	10,63
Mediana	72	70	69
<b>Colunas</b>	<b>Cefaleia</b>	<b>Enxaqueca simples</b>	<b>Enxaqueca complicada</b>
<b>Proteína (mg/ml)</b>			
Máxima	63	124	85
Mínima	5	14	20
Média	29,63	40,83	42,33
Desvio padrão	12,05	21,64	17,82
Mediana	27,5	38	40

### 3. Perfil do HLA-G

O HLA-G solúvel (sHLA-G) foi encontrado significativamente aumentado em relação ao grupo cefaleia no LCR dos pacientes com enxaqueca simples ( $P=0,0029$ ) e complicada ( $P=0,0009$ ).

Gráfico 1 – Perfil da concentração de HLA-G solúvel no LCR dos pacientes



Concentração de sHLA-G no LCR em ng/mL. Os níveis estão aumentados em enxaqueca simples ( $P=0,0029$ ) e enxaqueca complicada ( $P=0,009$ ).

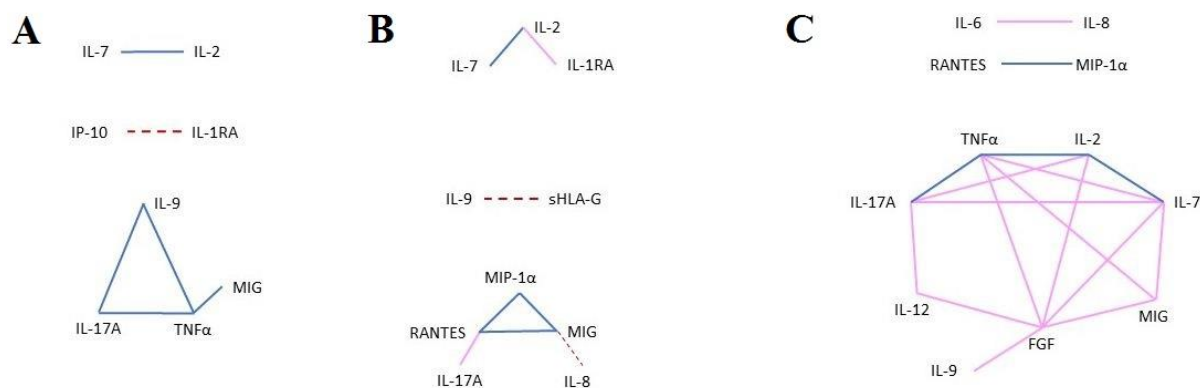
#### 4. Correlações entre moléculas imunológicas solúveis no líquido cefalorraquidiano

Na cefaleia, IP-10 e IL-1RA se correlacionam negativamente ( $\rho=-0,809$ ), enquanto que IL-2 e IL-7 se correlacionam positivamente ( $\rho=+0,887$ ). É observado também que MIG influencia positivamente TNF $\alpha$  ( $\rho=+0,826$ ), que por sua vez, influencia IL-17A e IL-9 ( $\rho=+0,851$  e  $\rho=+0,868$ , respectivamente) esses últimos também apresentam correlação positiva um com o outro ( $\rho=0,958$ ) (Figura 1A).

Na enxaqueca simples, os níveis de sHLA-G estão aumentados em relação a cefaleia e regulam negativamente a IL-9 ( $\rho=-0,825$ ). Apesar de, assim como na cefaleia, a IL-2 influenciar positivamente IL-7 ( $\rho=+0,832$ ), na enxaqueca simples essa citocina também exerce influência moderada na IL-1RA ( $\rho=+0,694$ ). A IL-8 exerce influência negativa sobre a MIG ( $\rho=-0,739$ ) que por sua vez influencia positivamente MIP-1 $\alpha$  e RANTES ( $\rho=+0,825$  e  $\rho=+0,879$ , respectivamente) e esta última modula moderadamente IL-17A ( $\rho=+0,689$ ) (Figura 4B).

Na enxaqueca complicada, os níveis de sHLA-G estão significativamente aumentados, porém essa molécula não parece exercer influência específica em nenhuma outra molécula. Assim como na cefaleia, encontra-se uma forte correlação positiva entre IL-2 e IL-7 ( $\rho=+0,862$ ) e TNF $\alpha$  e IL-17A ( $\rho=+0,864$ ). Uma forte correlação positiva também é encontrada entre RANTES e MIP-1 $\alpha$  ( $\rho=+0,801$ ) e IL-2 e TNF $\alpha$  ( $\rho=+0,828$ ). Nessa patologia, quinze diferentes moléculas se correlacionam formando uma rede de conexões complexa, mas apenas as moléculas citadas acima apresentam correlações fortes ( $\rho \geq 0,8$ ), as demais variam entre correlações fracas a moderadas ( $\rho < 0,8$ ) (Figura 4C).

Figura 1 - Diagrama da correlação entre as moléculas solúveis



Correlação entre moléculas solúveis dos pacientes com (A) cefaleia [ $n = 9$ ;  $\rho \geq 0,809$  a  $0,958$ ;  $P < 0,01$ ], (B) enxaqueca simples [ $n = 13$ ;  $\rho = 0,689$  a  $0,879$ ;  $P < 0,01$ ] e (C) enxaqueca complicada [ $n = 28$ ,  $\rho (+) = 0,480$  a  $0,864$ ;  $P < 0,01$ ]. As linhas pontilhadas em vermelho representam as correlações negativas, em azul escuro as correlações com  $\rho \geq 0,8$  e em rosa correlações com  $\rho$  entre  $0,6$  e  $0,79$ . Correlações com  $\rho < 0,6$  e/ou  $P > 0,01$  foram desconsideradas no diagrama.

## Discussão

Em cefaleia, o  $TNF\alpha$ , uma molécula constitutiva no SNC e conhecida pela indução e manutenção da inflamação (PROBERT 2015), se correlaciona positivamente com outras moléculas constitutivas do SNC, como as citocinas IL-17A e IL-9, moléculas responsáveis pela regulação da inflamação e proliferação celular (ROJAS-ZULETA; SANCHEZ, 2017. WAISMAN; HAUPTMANN; REGEN, 2015), e a quimiocina MIG. Esses resultados corroboram as evidências de que  $TNF\alpha$  possui um importante papel na homeostase imunológica no SNC (MCCOY; TANSEY, 2008; PROBERT 2015). Outro ponto observado é a correlação forte e negativa entre a IL-1RA e a IP-10. O IL-1RA, antagonista do receptor IL-1 é produzido pela micróglia e apresenta função redutora da inflamação (OH; CHOI; NOH; LEE; JEONG; JEON; SHIN; KIM; KIM; LEE, 2018). Por sua vez, a IP-10 é uma molécula constitutiva do ambiente cerebral com propriedade quimiotractorante, relacionada a migração de células T. Um estudo com camundongos knockout para IP-10 mostrou que esses animais exibem suscetibilidade aumentada à encefalite autoimune experimental (EAE) (KLEIN; IZIKSON; MEANS; GIBSON; LIN; SOBEL; WEINER; LUSTER, 2003). Em outro estudo, dessa vez com anticorpos bloqueadores de função em ratos, foi observado o agravamento da EAE (NARUMI; KABURAKI; YONEYAMA; IWAMURA; KOBAYASHI; MATSUSHIMA, 2002). Essas evidências sugerem que a IP-10 está envolvida na regulação da resposta imune no SNC.

Na enxaqueca simples, as quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  e MIG apresentam correlação positiva forte e recíproca. Essas moléculas são responsáveis pelo tráfico celular através da BBB (UBOGU; CALLAHAN; TUCKY; RANSOHOFF, 2006; WATSON; GOODKEY; FOOTZ; VORONOVA, 2020). Entretanto, na enxaqueca complicada, apenas RANTES e MIP-1 $\alpha$  se correlacionam positiva e fortemente, enquanto MIG se correlaciona moderadamente com o  $TNF\alpha$  que por sua vez, se mantém correlacionado positivamente a IL-17A e nos mesmos níveis encontrados em cefaleia (Apêndice 2), sugerindo um importante papel dessas moléculas na regulação da resposta imune no ambiente do SNC.

Por outro lado, o HLA-G, uma conhecida molécula reguladora da resposta imune (HUANG; AIRAS; SCHWAB; WIENDL, 2010), apresenta um aumento

significativo em ambas as enxaquecas em relação a cefaleia, sugerindo um equilíbrio na resposta inflamatória em enxaqueca complicada. O sHLA-G apresentou níveis aumentados de acordo com a gravidade da enxaqueca apresentada e, em enxaqueca simples, aparece regulando a IL-9. Em um estudo *in vitro* o HLA-G suprimiu a proliferação de células T (MORANDI; MARIMPIETRI; GÖRGENS; GALLO; SRINIVASAN; EL-ANDALOUSSI; GRAMIGNOLI, 2020). Em outro estudo *in vitro* o HLA-G também mostrou ação supressora na proliferação de neutrófilos (MOCIORNITA; ADAMSON; TUMIATI; ROSS; RAO; DELGADO, 2018). Essas evidências corroboram a ação supressora da resposta inflamatória e da proliferação celular do HLA-G.

## Conclusão

As enxaquecas não apresentam alterações bioquímicas e de celularidade em comparação a cefaleia. Entretanto, apresentam aumento de sHLA-G proporcional a gravidade da doença, além de aumento dos níveis de quimiocinas IL-8, MIG, IP-10 e de IL-9 na forma mais grave da doença, sugerindo maior complexidade das correlações recíprocas das moléculas imunes solúveis para controle da inflamação com uma forte correlação positiva entre TNF, IL-2, IL-7 e IL-17A e também RANTES e MIP-1a.

## Referências

- SHARMA, Kanika et al. Blood-Brain Barrier Disruption During Neuroinflammation. *Neuroinflammation*, [s.l.], p.529-539, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-811709-5.00030-2>.
- VARATHARAJ, Aravinthan; GALEA, Ian. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, And Immunity*, [s.l.], v. 60, p.1-12, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010>.
- ROSENBERG, G.a.. Cerebrospinal Fluid. *Primer On Cerebrovascular Diseases*, [s.l.], p.25-31, 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803058-5.00004-7>.
- INTERNATIONAL HEADACHE SOCIETY. Headache Classification Committee of the International Headache Society (IHS) The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition. *Cephalalgia*, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 1-211, jan. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/0333102417738202>.
- SADISSOU, Ibrahim et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. *Malaria Journal*, [s.l.], v. 13, n. 1, p.312-319, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-13-312>.
- PROBERT, L.. TNF and its receptors in the CNS: the essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, [S.L.], v. 302, p. 2-22, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.
- ROJAS-ZULETA, Wilmer Gerardo; SANCHEZ, Elizabeth. IL-9: function, sources, and detection. *Methods In Molecular Biology*, [S.L.], p. 21-35, 2017. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-6877-0_2).
- WAISMAN, Ari; HAUPTMANN, Judith; REGEN, Tommy. The role of IL-17 in CNS diseases. *Acta Neuropathologica*, [S.L.], v. 129, n. 5, p. 625-637, 26 fev. 2015.

Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1402-7>.

MCCOY, Melissa K; TANSEY, Malú G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal Of Neuroinflammation*, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 45, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-5-45>.

OH, Seung-Hun; CHOI, Chunggab; NOH, Jeong-Eun; LEE, Nayeon; JEONG, Yong-Woo; JEON, Iksoo; SHIN, Jeong-Min; KIM, Ji-Hye; KIM, Ho-Jin; LEE, Ji-Min. Interleukin-1 receptor antagonist-mediated neuroprotection by umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells following transplantation into a rodent stroke model. *Experimental & Molecular Medicine*, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 1-12, abr. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s12276-018-0041-1>.

KLEIN, Robyn S.; IZIKSON, Leonid; MEANS, Terry; GIBSON, Hilary D.; LIN, Eugene; SOBEL, Raymond A.; WEINER, Howard L.; LUSTER, Andrew D.. IFN-Inducible Protein 10/CXC Chemokine Ligand 10-Independent Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 172, n. 1, p. 550-559, 19 dez. 2003. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.550>

NARUMI, Shosaku; KABURAKI, Toshikatu; YONEYAMA, Hiroyuki; IWAMURA, Hiroyuki; KOBAYASHI, Yuko; MATSUSHIMA, Kouji. Neutralization of IFN-inducible protein 10/CXCL10 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *European Journal Of Immunology*, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1784, jun. 2002. Wiley. [http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141\(200206\)32:63.0.co;2-r](http://dx.doi.org/10.1002/1521-4141(200206)32:63.0.co;2-r).

UBOGU, Eroboghene E.; CALLAHAN, Melissa K.; TUCKY, Barbara H.; RANSOHOFF, Richard M.. Determinants of CCL5-driven mononuclear cell migration across the blood-brain barrier. Implications for therapeutically modulating neuroinflammation. *Journal Of Neuroimmunology*, [S.L.], v. 179, n. 1-2, p. 132-144, out. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.06.004>.

WATSON, Adrienne Eve Scovil; GOODKEY, Kara; FOOTZ, Tim; VORONOVA, Anastassia. Regulation of CNS precursor function by neuronal chemokines. *Neuroscience Letters*, [S.L.], v. 715, p. 134533, jan. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134533>.

HUANG, Yu-Hwa; AIRAS, Laura; SCHWAB, Nicholas; WIENDL, Heinz. Janus head: the dual role of hla-g in cns immunity. *Cellular And Molecular Life Sciences*, [S.L.], v. 68, n. 3, p. 407-416, 18 nov. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-010-0582-5>.

MORANDI, Fabio; MARIMPIETRI, Danilo; GÖRGENS, Andre; GALLO, Alessia; SRINIVASAN, Raghuraman Chittor; EL-ANDALOUSSI, Samir; GRAMIGNOLI, Roberto. Human Amnion Epithelial Cells Impair T Cell Proliferation: the role of hla-g and hla-e molecules. *Cells*, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 2123, 19 set. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells9092123>.

MOCIORNITA, Amelia G.; ADAMSON, Mitchell B.; TUMIATI, Laura C.; ROSS, Heather J.; RAO, Vivek; DELGADO, Diego H.. Effects of everolimus and HLA-G on cellular proliferation and neutrophil adhesion in an in vitro model of cardiac allograft vasculopathy. *American Journal Of Transplantation*, [S.L.], v. 18, n. 12, p. 3038-3044, 13 ago. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/ajt.15015>.

## ANEXO A – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo do polimorfismo da região promotora e da expressão do HLA-G em pacientes portadores de esclerose múltipla em uso de interferon- $\beta$

**Pesquisador:** Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 86325218.6.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDACAO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.636.284

#### Apresentação do Projeto:

Emenda para acrescentar ao protocolo de pesquisa dois objetivos (Elaboração de um modelo de regulação entre sHLA-G, citocinas incluindo IFN-, e quimosinas no sangue de pacientes com EM resistente ou não ao IFN-; Avaliar a alteração da barreira hematoencefálica ao diagnóstico do paciente com esclerose múltipla), além da criação de um biorrepositório para armazenamento de plasma, células imunológicas e líquido cefalorraquidiano.

#### Objetivo da Pesquisa:

Acrescentar objetivos e criação de biorrepositório.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

São previstos os riscos de constrangimento e de formação de hematomas, mas o pesquisador tomará as devidas medidas para minimizá-los.

Em relação aos benefícios, estão descritos os benefícios indiretos no TCLE.

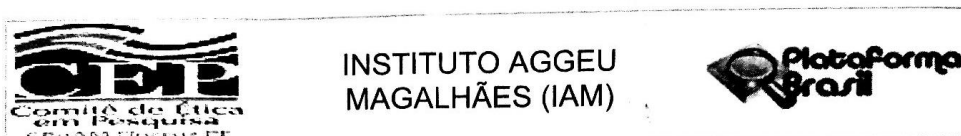
#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica a emenda.

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

Sem pendências.

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 3.636.284

**Recomendações:**

Não se aplica a emenda.

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

Não foram observados óbices éticos.

**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_1208165_E1.pdf	26/09/2019 22:59:59		Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	26/09/2019 22:56:26	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEEMCv3.pdf	26/09/2019 22:55:56	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEM2.pdf	12/08/2019 17:03:22	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Outros	RelatorioparcialCEP.pdf	26/07/2019 16:12:56	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Outros	folhaderosto.pdf	18/06/2019 17:25:34	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Termoassinado.pdf	18/06/2019 17:24:19	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartadeanuenciaKatherine.pdf	18/06/2019 12:18:22	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Outros	compromisso2.pdf	18/05/2018 20:26:40	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Norma.pdf	21/03/2018 09:33:49	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Donadi.pdf	21/03/2018 09:33:12	Norma Lucena Cavalcanti Licinio	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



INSTITUTO AGGEU  
MAGALHÃES (IAM)



Continuação do Parecer: 3.636.284

Declaração de Pesquisadores	Donadi.pdf	21/03/2018 09:33:12	da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Alvaro_moreia.jpeg	21/03/2018 09:32:09	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_hospital.jpeg	21/03/2018 09:30:06	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Rosto_assinada.pdf	21/03/2018 06:18:26	Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 11 de Outubro de 2019

Assinado por:

Maria Almerice Lopes da Silva  
(Coordenador(a))

Maria Almerice Lopes da Silva  
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa  
Mat. Saopé 1362520  
IAM / FIOCRUZ

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br