

**THAIANA DE OLIVEIRA SACRAMENTO**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA ,  
*HLA-DRB1*\* E NÍVEIS SÉRICOS DE IgG EM UMA POPULAÇÃO  
MISCIGENADA DE SALVADOR, BA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Meyer

Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Lamare

Salvador

2016

Ficha catalográfica elaborada por Maria de Fátima Cleômenis Botelho,  
Bibliotecária – CRB-5/908

---

Sacramento, Thaiana de Oliveira

S123e      Estudo de Associação entre Esclerose Múltipla, *HLA-DRB\*1* e níveis séricos de IgG em uma população miscigenada de Salvador, Ba/ Thaiana de Oliveira Sacramento. – Salvador, 2016.

84 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento .

Co-orientador: Profa. Dra. Denise Carneiro Lemaire.

1. Esclerose Múltipla. 2. Imunoglobulina G. I. Meyer, Roberto José Nascimento. II. Lemaire, Denise Carneiro. III. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

---

CDU: 616.8

**TERMO DE APROVAÇÃO THAIANA DE**

**OLIVEIRA SACRAMENTO**

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA , *HLA-DRB1\** E  
NÍVEIS SÉRICOS DE IgG EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA DE  
SALVADOR, BA.**

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos  
dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia.

Banca Examinadora

Roberto José Meyer Nascimento – Orientador \_\_\_\_\_

Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia

Denise Carneiro Lemaire – Co-Orientadora \_\_\_\_\_

Doutora em Imunologia pelo Universite D'aix Marseille II, França

Universidade Federal da Bahia

Soraia Castro Trindade \_\_\_\_\_

Pós-doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia

Universidade Estadual de Feira de Santana

Fernando Luís de Queiroz Carvalho \_\_\_\_\_

Doutor em Patologia Humana

Universidade do Estado da Bahia

Vera Vale \_\_\_\_\_

Doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia

Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 22 de novembro de 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO  
PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS

Aos vinte e dois dias do mês de novembro de dois mil e dezesseis, reuniu-se em sessão pública o Colegiado do Programa de Pós- Graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas com a finalidade de apreciar a **Defesa Pública de Tese** da Doutoranda, **Thaiana de Oliveira Sacramento**, através da Comissão Julgadora composta pelos **Professores, Roberto José Meyer Nascimento, Denise Carneiro Lemaire, Soraya Castro Trindade, Fernando Luís de Queiroz Carvalho e Vera Lucia Costa Vale**. O título da Tese apresentada foi. **Estudo da frequência dos alelos *HLA-DRB1\** em uma população de portadores de esclerose múltipla e sua associação com os níveis séricos de IgG**. Ao final dos trabalhos, os membros da mencionada Comissão Examinadora emitiram os seguintes pareceres:

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento Aprovada  
Profa. Dra. Denise Carneiro Lemaire Denise - Aprovada  
Profa. Dra. Soraya Castro Trindade Aprovada  
Prof. Dr. Fernando Luís de Queiroz Carvalho APROVADA  
Profa. Dra. Vera Lúcia Costa Vale Aprovada

Franqueada a palavra, como não houve quem desejasse fazer uso da mesma lavrou-se a presente ata que após lida e aprovada, foi assinada por todos.

Salvador, Bahia, 22 de novembro de 2016

Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento [Assinatura]  
Profa. Dra. Denise Carneiro Lemaire [Assinatura]  
Profa. Dra. Soraya Castro Trindade [Assinatura]  
Prof. Dr. Fernando Luís de Queiroz Carvalho [Assinatura]  
Profa. Dra. Vera Lúcia Costa Vale [Assinatura]

SACRAMENTO, Thaiana de Oliveira. *Estudo de associação entre esclerose múltipla , HLA-DRB1\* e níveis séricos de IgG em uma população miscigenada de Salvador, Ba.84 f. il. 2016. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.*

## RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença que afeta preferencialmente o sistema nervoso central de mulheres jovens, causando-lhes graus variáveis de incapacidades física e cognitiva. Etiologicamente associa fatores ambientais, biológicos, sócioeconômicos e genéticos, como por exemplo genes do MHC classe II, especialmente os alelos *HLA-DRB1\*15*. Seu diagnóstico é bastante difícil, mas níveis solúveis de IgG podem sugerir atividade da doença. **Objetivo:** Determinar a frequência dos alelos *HLA DRB1\** na população baiana em geral e em portadores de esclerose múltipla atendidos no centro de referência do CHUPES, UFBA, no período de outubro de 2014 a abril de 2015 e associá-las aos níveis séricos de IgG. **Metodologia:** Estudo do tipo caso-controle, aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de medicina da Universidade Federal da Bahia (CAAE: 3517134.0.0000.5577), que envolveu uma amostra de conveniência composta por 197 indivíduos, cujos dados sócioclínico-demográficos foram coletados através de questionário desenvolvido para a pesquisa. A genotipagem dos alelos *HLA-DRB1\** foi realizada através da técnica “HLA-DR SSO Genotyping Test” e a determinação dos níveis séricos de IgG por nefelometria. **Resultados:** A análise quantitativa revelou um perfil genotípico do tipo *HLA-DRB1\*15* (20,5%) em mulheres (83,0%) das raças negra ou parda (75,0%), com faixa etária entre 30 e 39 anos (28,0%), que desenvolveram a forma surtorremissiva da doença (76,0%), nas fases mais avançadas da vida (55,0%), sem permanência de sequela clínica (70,0%) e que usavam algum tipo de Interferon (58,0%). O IgG sérico para o grupo de doentes alcançou valor médio de  $1.410 \pm 323$  mg/dL, e nos controles, esta média foi de  $1.532 \pm 310$  mg/dL. A análise qualitativa indicou maiores frequências, nas formas progressivas de esclerose múltipla dos grupos alélicos *HLA-DRB1\*12* (22,0%), e dos alelos *HLA-DRB1\*13* (12,6%) e *HLA-DRB1\*15* (22,0%) naqueles indivíduos com a forma surto-remissiva. Negros e pardos demonstraram maior prevalência do alelo *HLA-DRB1\*15* (24,0%), enquanto que nos brancos maior frequência do alelo *HLA-DRB1\*07* (20,0%) foi encontrada. Negros e pardos portadores da doença tenderam a apresentar maiores níveis séricos médios de IgG (25,4%). **Conclusão:** Houve forte associação entre as frequências alélicas encontradas e as variáveis raça/etnia e forma clínica da doença. Nesta população, os níveis séricos de IgG não parecem servir como marcadores de progressividade.

**Palavras-chave:** esclerose múltipla; frequência alélica; Genes classe II do complexo de histocompatibilidade (MHC); Imunoglobulina G.

SACRAMENTO, Thaiana de Oliveira. *Association study of multiple sclerosis, HLA-DRB1 \* and serum IgG levels in a mixed population of Salvador, Ba.* 84 f.il.2016. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

## ABSTRACT

Multiple sclerosis is a disease that primarily affects the central nervous system of young women, causing them varying degrees of physical and cognitive disabilities. Etiologically, it associates environmental, biological, socioeconomic and genetic factors, such as MHC class II genes, especially the HLA-DRB1 \* 15 alleles. Its diagnosis is quite difficult, but soluble IgG levels may suggest disease activity. **Objective:** To determine the frequency of HLA DRB1 \* alleles in the Bahian population in general and in multiple sclerosis patients attended at the reference center of CHUPES, UFBA, from October 2014 to April 2015 and associate them with serum IgG levels. **Methodology:** A case-control study, approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the Federal University of Bahia (CAAE: 3517134.0.0000.5577), which involved a convenience sample of 197 individuals whose socio-demographic data were collected through Of a questionnaire developed for the research. Genotyping of the HLA-DRB1 \* alleles was performed using the HLA-DR SSO Genotyping Test technique and the determination of serum IgG levels by nephelometry. **Results:** The quantitative analysis revealed a genotypic profile of HLA-DRB1 \* 15 type (20.5%) in women (83.0%) of the black or brown races (75.0%), with ages ranging from 30 to 39 years (28.0%), who developed the disease-repellent form (76.0%), in the most advanced stages of life (55.0%), without clinical sequelae (70.0%) and who used some type Of Interferon (58.0%). Serum IgG for the group of patients reached an average value of  $1,410 \pm 323$  mg / dL, and in controls, this mean was  $1.532 \pm 310$  mg / dL. The qualitative analysis indicated higher frequencies in the progressive forms of multiple sclerosis of the HLA-DRB1 \* 12 allele groups (22.0%) and the HLA-DRB1 \* 13 (12.6%) and HLA-DRB1 \* 15 (22, 0%) in those individuals with the outbreak-remission form. Blacks and mulattos showed a higher prevalence of the HLA-DRB1 \* 15 allele (24.0%), while in whites the highest frequency of the HLA-DRB1 \* 07 allele (20.0%) was found. Blacks and mulattos with the disease tended to present higher serum IgG levels (25.4%). **Conclusion:** There was a strong association between the allelic frequencies found and the race / ethnicity and clinical form of the disease. In this population, serum IgG levels do not appear to serve as markers of progressivity.

**Keywords:** multiple sclerosis; allelic frequency; Genes, MHC Class II, Immunoglobulin G.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Prevalência da esclerose múltipla no mundo.....	21
Figura 2 - Internamentos por esclerose múltipla (2008-2015).....	22
Figura 3 - Delimitação do estudo.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número e proporção de portadores de EM (N=100), de acordo com as variáveis sócio-clínico-demográficas.....	46
Tabela 2 - Frequência dos grupos alélicos do <i>HLA-DRB1*</i> na amostra de portadores de EM (N=100).....	46
Tabela 3 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> em portadores de EM,(N=100) e nos doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, inscritos no REDOME (N=109.424).....	48
Tabela 4 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a forma clínica da doença.....	50
Tabela 5 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> nos portadores de EM (N=100),organizada segundo a raça/etnia.....	51
Tabela 6 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a idade de diagnóstico da EM.....	52
Tabela 7 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com com a gravidade da doença.....	53
Tabela 8 - Características do grupo de portadores de EM (N=100), do grupo controle (N=97) e percentual de indivíduos por níveis séricos de IgG.....	54
Tabela 9 - Dados clínico-laboratoriais do grupo de portadores de EM .....	55
Tabela 10 - Frequência dos alelos <i>HLA-DRB1*</i> nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com os níveis séricos de IgG.....	74



## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1- Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* em portadores de EM (N=100) e nos doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, incritos no REDOME (N=109.424).....47
- Gráfico 2 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a forma clínica da doença.....48
- Gráfico 3 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100),organizada segundo a raça/etnia.....50
- Gráfico 4 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a idade de diagnóstico da EM.....51
- Gráfico 5 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com a gravidade da doença.....52
- Gráfico 6 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM \* (N=100), organizada de acordo com os níveis séricos de IgG.....55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primária Progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundária Progressiva
GA	Acetato de Glamatirama
IFN- $\beta$	Interferon tipo $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon tipo $\gamma$
IgG	Imunoglobulina tipo G
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MBP	Proteína Básica de Mielina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i>
PMP	Micropartícula Plaquetária
RNM	Exame de Ressonância Magnética
T1	Tempo Curto de Repetição da Onda Magnética

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	14
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1	EPIDEMIOLOGIA .....	20
3.2	ETIOPATOGENIA .....	22
3.2.1	O papel do MHC na etiologia da esclerose múltipla .....	24
3.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS .....	25
3.4	FORMAS CLÍNICAS .....	27
3.5	DIAGNÓSTICO .....	27
3.6	TRATAMENTO .....	29
3.6.1	Glicocorticóides e Corticosteróides .....	29
3.6.2	Imunomoduladores .....	30
3.6.2.1	Interferon.....	30
3.6.2.2	Acetato de Glamatirama.....	30
3.6.3	Imunossupressores .....	31
3.6.4	Anticorpos Monoclonais .....	31
3.6.5	Outros Tratamentos .....	32
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
4.1	OBJETIVO GERAL .....	34
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
5.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	36
5.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	37
5.3	ASPECTOS ÉTICOS.....	37
5.4	FASE DE COLETA .....	38
5.4.1	Coleta dos dados sócio-clínico-demográficos.....	38
5.4.2	Coleta do sangue .....	38

5.5	FASE DE ANÁLISE .....	39
5.5.1	GENOTIPAGEM <i>HLA-DRB1</i> * .....	39
5.5.1.1	Extração e purificação do DNA .....	39
5.5.1.2	Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA .....	40
5.5.1.3	Genotipagem <i>HLA-DRB1</i> * .....	40
5.5.1.3.1	Amplificação do DNA genômico.....	40
5.5.1.3.2	Eletroforese do DNA amplificado.....	41
5.5.1.3.3	Hibridização para Genotipagem .....	41
5.6	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IgG.....	41
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
6.1	Caracterização da amostra de estudo .....	44
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>56</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>65</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>78</b>
	APÊNDICE A-Termo de Consentimento Informado.....	79
	APÊNDICE B - Ficha de Coleta.....	81
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>82</b>
	ANEXO A - Comprovante de Envio ao Comitê de Ética em Pesquisa .....	83
	ANEXO B - Folha de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	84

## **1 HIPÓTESE**

O perfil dos grupos alélicos *HLA-DRB1*\*15 dos portadores de esclerose múltipla (EM) atendidos no centro de referência do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, UFBA, no período de outubro de 2014 a abril de 2015 pode estar associado a indicadores sócio-demográficos tais como sexo e raça/etnia, além de influenciar o curso clínico da doença, determinando a idade de acometimento, forma clínica, presença de seqüela e níveis séricos de IgG.



A esclerose múltipla (EM) é considerada uma das mais intrigantes doenças neurológicas em virtude de seu caráter autoimune, crônico, frequência e tendência em acometer adultos jovens (CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; RAMAGOPALAN et al., 2009). Suas características crônicas e incapacitantes determinam custos substanciais aos cofres públicos, pois restringem temporária ou definitivamente as atividades econômicas e sociais de seus portadores, impactando ainda na vida de seus familiares (FRAGOSO, FIORE, 2005; CARDOSO et al., 2006; SANTOS, YOKOTA, DIAS, 2007; SELTER et al., 2013).

As características clínicas e epidemiológicas da EM podem variar de acordo com fatores ambientais e genéticos (CALLEGARO, GOLDBAUM, MORAIS, 2001; ROSATI, 2001; PUGLIATTI, SOTGIU, ROSATTI, 2002; PUGLIATTI, RIISE, SOTGIU, 2005; CORONA e ROMAN; 2006; CORREALE, 2009; CRISTIANO, PATRUCCO, GIUNTA, 2010; MERO et al., 2013). A taxa de incidência anual que variou de 0.15 para 19 por 100.000 casos por 100.000 habitantes, em países das zonas equatoriais (CRISTIANO et al; 2012).

Semelhantemente a outras doenças autoimunes a EM é considerada uma desordem multifatorial que associa agentes etiológicos ambientais e genéticos (BETTENCOURT et al., 2012). Diversos genes estão associados à EM no que diz respeito susceptibilidade das populações, contudo, alelos associados ao Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC classe II), tais como *HLA DRB1\*1501*, merecem destaque, pois foram associados à EM na América do Norte e Europa; o *HLA DRB1\*1501*, *HLA DRB1\*0301* e *HLA DRB1\*0401* nos italianos e o haplótipo *HLA DRB1\*04* prevalente em turcos e canadenses. No Brasil, o alelo *HLA DRB1\*1501* tem sido correlacionado à doença em brancos no Rio de Janeiro (BRUM et al., 2007; GRZESIUK, 2011).

Ainda não foram identificados especificidades de anticorpos característicos, cuja pesquisa ou dosagem sejam úteis para o diagnóstico da EM. Entretanto, a detecção de bandas oligoclonais de IgG constitui o biomarcador mais sensível do ponto de vista bioquímico para o diagnóstico da doença (IMRELL et al., 2009; LECHNER-SCHOTT et al., 2011; BRANDLE, 2016).

A relevância deste trabalho reside na investigação da possível associação entre os níveis de IgG sérico com vistas a desenvolver um possível biomarcador que torne o



diagnóstico, tratamento e prognóstico mais rápido e preciso. Por outro lado, o conhecimento do comportamento dos alelos *HLA DRB1\*15* na população baiana fornece evidências importantes da sua influência na ocorrência da EM nesta população, de rico legado genético.

### **3 REVISÃO DE LITERATURA**

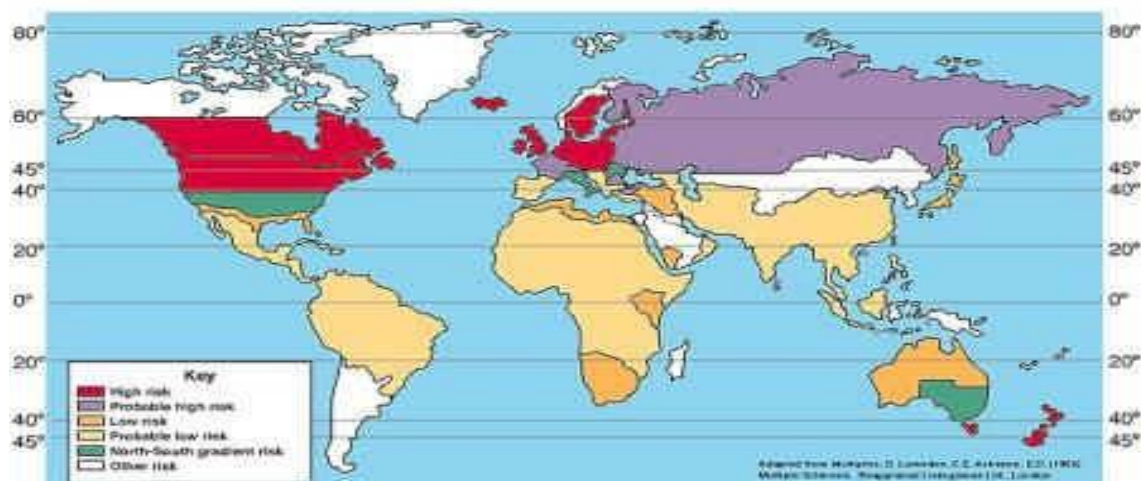
A esclerose múltipla (EM) é uma inflamação imunomediada e crônica do SNC, que tende a acometer preferencialmente mulheres jovens. Ela é caracterizada por repetidos episódios de destruição da mielina, o que, conseqüentemente, determina vários tipos de perdas neurológicas que se refletem em diferentes graus de incapacidades físicas e cognitivas (HONAN et al., 1978; ANDERSON e GOODKIN, 1996; CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; POLMAN e UITDEHAAG, 2000; CRITCHLEY, 2004; VIRLEY, 2005; ARAUJO, MOREIRA, LANA-PEIXOTO, 2006; CARDOSO et al., 2006; GALLUD et al., 2006; GRZESIUK, 2006; RAMAGOPALAN et al., 2007; KILLESTEIN e HARTUNG, 2008; SAWCER, 2008; LOURENÇO et al; 2012; BAKSHI et al., 2016; ).

A EM é a doença inflamatória mais comum do SNC (GARCÍA; SALAVIERRI, 2006; ISOBE, et al; 2016). Caracterizada por uma desmielinização das fibras nervosas e infiltrado perivascular de plasmócitos, linfócitos e macrófagos (MINGUETTI, 2001; BINDER et al; 2016).

### 3.1 EPIDEMIOLOGIA

Normalmente, a EM é considerada uma doença característica de regiões de clima frio e temperado (entre os paralelos 44<sup>o</sup> e 64<sup>o</sup>), o que classifica tais regiões do globo, que possuem casuística superior a 300/100.000 habitantes, como áreas de alta prevalência, correspondendo ao norte da Europa, sul da Austrália e porção central da América do Norte (ISOBE et al; 2016; BINDER et al; 2016). Por outro lado, áreas com número de casos inferiores a 5/100.000 habitantes são consideradas regiões com baixa prevalência, correspondentes às zonas quentes do globo, como a África e zonas equatoriais (ABREU, et al; 2012; CARDOSO et al., 2006)

A Figura 1, a seguir, ilustra a distribuição da EM ao redor do globo.



Legenda: ■ >100 ■ 60.01-100 ■ 20.01-60  
■ 5.01-20 ■ 0-5  0

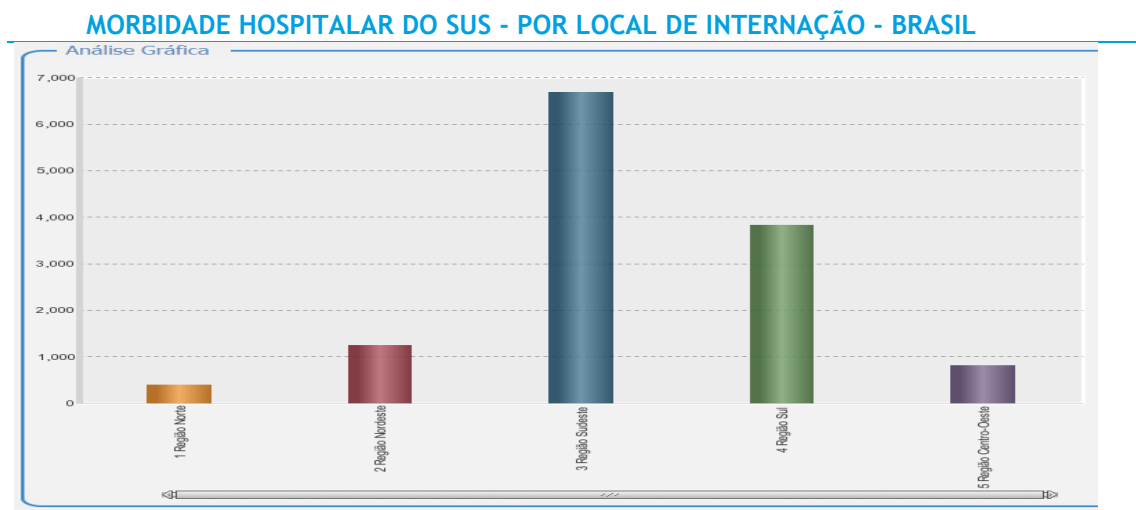
**Figura 1** – Prevalência da esclerose múltipla no mundo.

**Fonte:** Atlas Multiple Sclerosis Resources in the world (2016)

Fonte: [http://www.who.int/mental\\_health/neurology/Atlas\\_MS\\_WEB.pdf](http://www.who.int/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf). (Acesso em 23/11/2016)

No Brasil, há regiões que apresentam média incidência, como demonstram estudos realizados em cidades como São Paulo, Belo Horizonte e Botucatu (LANA-PEIXOTO et al; 2002; GRZESIUK, 2011). Acredita-se que a diferença entre as prevalências das diversas regiões do país seja explicada, em parte, pela diversidade genética e pela miscigenação. Esses fatores, somados à extensão territorial do Brasil, seriam os responsáveis pela concentração de algumas características genéticas e fenotípicas em diferentes regiões. (GRZESIUK, 2006; ALVES-LEON et al; 2008; SILVA et al., 2009; PARADELA et al., 2014).

Na Figura 2, a seguir, pode-se verificar maior incidência da doença na região Sudeste, que apresentou 6.689 casos de internação e na região Sul com 3.837 registros. A região Nordeste, neste mesmo período, registrou 1.249 casos.



**Figura 2** – Internamentos por esclerose múltipla: 2008-2015.

Fonte: <http://www2.datasus.gov.br> <acesso em 28/11/2016>

### 3.2 ETIOPATOGENIA

A etiologia da EM ainda não está esclarecida, mas diversos pesquisadores consideram-na de natureza heterogênea. (LISAK et al., 1975; HUGHES, 1994; CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; POLMAN e UITDEHAAG, 2000; CRITCHLEY, 2004; VIRLEY, 2005; GALLUD et al., 2006; KILLESTEIN e HARTUNG, 2008; SILVA et al., 2009).

Diversos fatores – aspectos geográficos, socioculturais, demográficos e biológicos (incluindo hereditários) e constituição, além do estilo de vida (estresse e tabagismo) – têm sido relacionados ao desenvolvimento e à distribuição geográfica e racial da EM no mundo. Tais aspectos influenciam diretamente na composição genética individual, atuando, conseqüentemente, na etiologia da doença, por ativação do sistema imune (LISAK et al., 1975; CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; CRITCHLEY, 2004; HOLLEMBACH E OKSEMBERG; 2015; BINDER et al; 2016).

Silva et al. (2009), avaliando fatores de risco potenciais para EM no estado do Rio de Janeiro, observaram associação estatisticamente significativa entre a imunização, o hábito de fumar, a ingestão de cérebro animal, e o aumento do risco de desenvolvimento da doença. Os autores, entretanto, não explicaram esta associação.

Também tem sido descrita a associação da interação da vitamina D com o sistema imunológico, na etiologia da EM (ASCHERIO, 2010; TEIXEIRA e COSTA; 2012).

Esta relação se justifica por meio de sua ação sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), além de interferir na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*. (MARQUES et al., 2010; TEIXEIRA e COSTA; 2012), além da localização de seus receptores na região do MHC classe II (RAMAGOPALAN et al; 2009).

Indícios sugerem que algum fator ambiental, como um vírus que persiste no SNC ou que desaparece após a agressão, parece interagir, em circunstâncias específicas, com um organismo geneticamente suscetível (POLMAN e UITDEHAAG, 2000), o que confirma a evolução da doença na forma de surtos e remissões, causando elevação de IgG, de IgM e das faixas oligoclonais na dosagem de proteínas do líquido cefalorraquidiano (LCR), além da diminuição da população de linfócitos T supressores. (HUGHES, 1994; POLMAN e UITDEHAAG, 2000; DA GAMA et al; 2009; IMRAN et al; 2016; LARONI, et al; 2016). O aumento da síntese de C3c no soro e LCR coincide com a ocorrência de incapacidade neurológica em indivíduos com diagnóstico de EM (PADILLA-DOCAL et al; 2007)

Infecções, traumas, tensão emocional e exercícios físicos fatigantes são tidos como capazes de desencadear os surtos, por ativação dos Linfócitos T autorreativos no sistema circulatório, acelerando sua movimentação por meio da barreira hematoencefálica, levando ao desenvolvimento de um halo de linfócitos e à destruição da bainha de mielina no SNC (POLMAN e UITDEHAAG, 2000; BAECHER-ALLAN e HAFLER, 2004; VIGLIETA et al; 2004; VENKEN et al; 2007; ASTIER, 2008; LARONI et al; 2016; IMRAM et al; 2016).

O aumento na contagem de plaquetas bem como das estruturas a elas associadas (micropartículas plaquetárias – PMP, agregantes plaquetários, P-selectina, plaquetas associadas a IgG, IgM) tem relação com a EM uma vez facilita a travessia do endotélio para os linfócitos, por meio do aumento da expressão de integrinas (SHEREMATA et al; 2008).

Todos estes fatores etiológicos determinam o aparecimento no SNC de um infiltrado inflamatório bem delimitado, áreas de destruição da mileina, ativação das células da micróglia, proliferação de astrócitos, além de variáveis graus de degeneração axonal associada à stress oxidativo e injúria mitocondrial, característico da EM (LASSMANN, 2014).

A susceptibilidade individual para desenvolver EM é bastante influenciada pelo perfil étnico e histórico familiar, o que sugere que o componente genético tem papel determinante no risco para a doença (HOLLENBACH, OHSEMBERG; 2015).

Do ponto de vista genético, os alelos *HLA-DRB1\**, em especial os do grupo *HLA-DRB1\*15*, desempenham papel importante na etiologia da EM, pois já foram associados a doença em Portugal (SILVA et al., 2007), Lituânia (BALNYTE et al; 2015), Canadá (DYMENT et al; 2005) e Brasil (SANTOS et al; 2002; GRZESIUK, 2011; PARADELA et al; 2014).

### 3.2.1. O PAPEL DO MHC NA ETIOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

A associação entre os antígenos *HLA-3* e *HLA-B7* HLA e EM foi descrita a primeira vez em 1972 (BERTRAMS e KUWERT, 1972; NAITO et al., 1972; BINDER et al; 2016). Relatos da existência de associações mais fortes com antígenos de classe II do MHC, principalmente DR e DQ também foram feitos (REZENDE e ARRUDA, 1996).

Estudos mais recentes, conseguiram mostrar associação da EM com os genes *DQA1\*0102* e *DQB1\*0602* quando se excluiu as famílias onde um dos integrantes é homocigoto para *DQA1\*0102* (MARROSU et al., 1988; TIENARI et al; 1993; EBERS, 1994; GARCÍA, SALAVIERI; 2006; MOUTSIANAS et al; 2015).

O genótipo HLA está fortemente relacionado na tendência e/ou proteção à doenças auto-imunes. Os alelos *DQB1\*0602*, *DQA1\*0102* e *DRB1\*1501* têm sido bastante relacionados ao desenvolvimento da EM na população caucasiana. Contudo, o alelo *DQB1\*0602* parece conferir susceptibilidade à doença, mesmo na ausência de ocorrência dos alelos *DQA1\*0102*, *DRB1\*15018* (CARVALHO et al., 2003; RAMAGOPALAN et al; 2007; ISOBE et al; 2016). A ocorrência dos alelos DR/DQ em conjunto com propriedades estruturais específicas, parece estar mais fortemente associadas à EM e outras imunopatogenias do que a apresentação do antígeno isoladamente (ALCINA et al., 2012).

A semelhança estrutural da MBP (Proteína Básica de Mileina) com antígenos virais fortalece a hipótese do mimetismo molecular; a existência de linfócitos T autorreativos na corrente sanguínea e líquido céfalo-raquidiano (LCR), além do aparecimento de células apresentadoras de antígeno nas meninges e espaços perivasculares do SNC afetado, justificam a expressão atípica de moléculas do MHC classe II na etiologia da EM (ATKINS et al., 2001; LARONI et al; 2016). O MHC também pode determinar mudanças nas características clínicas e imunológicas da EM, e influenciar a resposta do indivíduo às principais terapias disponíveis para o tratamento da EM, uma vez que muitos pacientes não respondem à terapia imunomoduladora ou ainda apresentam uma resposta fraca (OKSENBERG e BARANZINI, 2010). Correlações positivas entre presença do alelo *HLA-DRB1\*15* e resposta a terapia com Acetato de Glamatirama foram relatadas por Fusco et al. (2001), enquanto que a associação entre os alelos de classe II e resposta à terapia com IFN- $\beta$  ainda não pôde ser confirmada (FUSCO et al., 2001; PEREIRA et al; 2012).

Alguns alelos HLA foram sugeridos como fator de proteção contra a EM em certos grupos raciais, tais como o *HLA-DRB1\*09* cuja baixa prevalência entre portadores da doença, sugerem que este alelo figura como um fator de proteção (DYMENT et al; 2005; CRISTIANO et al., 2012). Segundo Gorodezky, Castro - Escobar e Escobar-Gutiérrez (1985), as populações são muito heterogêneas do ponto de vista genético, o que determina variações na ocorrência da doença. No Paraguai e Argentina, predomina a influência caucasiana na composição populacional, enquanto que na América Central e Caribe se faz mais presente a herança de mestiços, ou seja, uma complexa mistura heterogênea entre caucasianos e ameríndios (GRZEIUK, 2011).

### 3.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Ela afeta, preferencialmente, adultos jovens, na faixa etária de 20 a 40 anos, do sexo feminino, da raça branca, numa proporção de 2:1 em relação ao sexo (HONAN et al., 1978; ANDERSON e GOODKIN, 1996; CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; POLMAN e UITDEHAAG, 2000; CRITCHLEY, 2004; VIRLEY, 2005; CARDOSO et al., 2006; GALLUD et al., 2006; GRZESIUK, 2006; ALVES-LEON et al., 2008; KILLESTEIN e HARTUNG, 2008; SAWCER, 2008; ISOBE et al; 2016).



Indivíduos pertencentes a determinadas populações, como esquimós e japoneses, aparentemente apresentam certa proteção contra a EM (SCHIFFMAN, 1976; CRAELIUS, 1978).

Do ponto de vista clínico, a doença se manifesta com períodos de exacerbações e remissões. Seu curso clínico varia de indivíduo para indivíduo. A apresentação clínica da EM foi modificada nos últimos anos, devido às novas terapias, que modificaram o curso clínico da doença (PEREIRA et al.; 2012). Contudo, diversos sintomas, reflexos da desmielinização do SNC ou do bloqueio da transmissão do impulso nervoso no nível dos axônios, podem contribuir para a redução da qualidade de vida dos pacientes, tais como distúrbios do sono, fadiga e depressão (MOREIRA et al., 2008). A EM pode se manifestar na forma de problemas visuais (49%), como cegueira parcial ou total, dor ocular unilateral, diplopia ou neurite óptica, dormência em membro ou membros e hemiplegia (43%), distúrbios sensoriais (23%) e disfunção geniturinária (10%). Sinais de lesão cerebral são menos frequentes (4%) e incluem ataxia, disartria, convulsões, movimentos involuntários, ansiedade e histeria. A fadiga, ou exaustão constante, acomete 75 a 90% dos portadores de EM (MOREIRA et al., 2008), e estima-se ser o sintoma mais grave em 40 % dos pacientes.

Sintomas no complexo orofacial podem constituir a primeira manifestação e, dentre eles, podemos destacar a neuralgia de trigêmeo, paralisia facial e dormência (FERROLI, 2001; CRITCHLEY, 2004; VIRLEY, 2005; GALLUD et al., 2006; MITCHELL et al., 2008; SACRAMENTO et al.; 2011).

Sintomas psicológicos como alterações de humor, transtorno bipolar, euforia e estado de apatia são descritos em coexistência com a esclerose múltipla desde os primeiros relatos da doença. Dentre os sintomas emocionais, a depressão é o achado mais frequente. A depressão pode ser o reflexo clínico da desmielinização ativa de regiões subcorticais do sistema nervoso, ou apenas uma associação de fatores, pois alguns estudiosos acreditam que os sintomas depressivos resultam do medo e da apreensão diante do diagnóstico e das restrições que normalmente acompanham o desenvolvimento da doença (MEANEY et al., 1995; MENDES et al., 2003; YBARRA et al., 2007).

### 3.4 FORMAS CLÍNICAS

A classificação das formas evolutivas de EM, é feita de acordo como o Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia que recomenda a adoção da classificação de LUBLIN e Col. (1996). Segundo este critério, a EM pode evoluir de 3 formas:

*Remitente-recorrente* (EMRR) é a forma evolutiva de EM mais comum, caracterizada pelo aparecimento de surtos com algum grau de disfunção clínica e que duram, no mínimo, 24 horas, podendo estender-se por semanas. Após esse período, os surtos podem remitir total ou parcialmente, sendo que, entre eles, não há evidências de progressão da doença. O número de surtos decresce com a evolução da doença. Não há progressão dos déficits entre os surtos (FERNANDES, 2009).

*Secundariamente progressiva* (EMSP) é uma forma caracterizada por surtos de exacerbação-remissão. Ocorre quando o grau de incapacidade persiste e (ou) se agrava durante os surtos. Inicia-se como surto-remissão e, após alguns anos, passa a progredir ininterruptamente.

*Primariamente progressiva* (EMPP) (19%) é a forma em que a doença progride sem surtos aparentes desde o início.

### 3.5 DIAGNÓSTICO

Diante da variedade de quadros clínicos que a doença pode apresentar o diagnóstico torna-se bastante difícil. Ele é baseado na determinação dos achados clínicos e na exclusão de todos os outros distúrbios que tenham características clínicas semelhantes às da EM. Atualmente, o Departamento Científico de Neuroimunologia da Academia Brasileira de Neurologia propõe a adoção dos critérios firmados pelo painel internacional para o diagnóstico da esclerose múltipla, de Mc Donald et al., (2006). (GARCÍA e SALAVIERRI, 2006).

Essa etapa está fundamentada numa investigação clínica profunda, aliada aos

exames de imagem, especificamente a RNM (SCHIFFMAN, 1976), onde lesões na substância branca periventricular e lesões centro-semiovais e no corpo caloso, são bastante frequentes (MINGUETTI, 2001). Alterações na atividade dos neurônios podem ser detectadas no exame de eletroencefalograma (EEG) (VAZQUEZ-MARRUFO et al., 2008). Neste exame, portadores da forma surto-remissiva apresentam atividade cerebral alterada, quando comparados àqueles portadores de outras formas clínicas (VAZQUEZ-MARRUFO et al; 2008)

O diagnóstico também pode ser auxiliado pelos exames de potenciais evocados visual, auditivo e somatossensorial, úteis para detectar lesões silenciosas de desmielinização (GARCÍA e SALAVIERRI, 2006). Tais testes são úteis apenas quando se buscam lesões subclínicas no SNC de indivíduos suspeitos de EM (MINGUETTI, 2001).

Embora ainda não existam anticorpos circulantes característicos da EM aceitos para a mensuração laboratorial, a detecção de bandas oligoclonias de IgG constitui o biomarcador mais sensível do ponto de vista bioquímico para o diagnóstico da doença (IMRELL et al., 2009; BRANDÃO et al; 2005; BRANDLE et al; 2016; HALBGEBAUER et al; 2016). Uma análise minuciosa do líquido céfalo-raquidiano de portadores de esclerose múltipla que inclui citologia, função da barreira hematoencefálica e síntese intratecal de IgG é considerada protocolo padrão durante o diagnóstico/ prognóstico da EM, segundo o COMITÊ EUROPEU DE LUTA CONTRA A EM. (ANDERSON et al., 1994; DECKER et al; 2016). A síntese Intratecal de IgG, que tem sido associada à traços discretos de banda oligoclonal de imunoglobulina tipo G, não detectáveis no soro de indivíduos saudáveis. A presença de duas bandas no LCR de um indivíduo já é recurso suficiente para indicar síntese de IgG no SNC e é um dos critérios para o diagnóstico da EM, juntamente com as evidências clínicas e imagenológicas (LINK e HUANG, 2006; LOURENÇO et al; 2012; BAKSHI, et al; 2015).

A busca por moléculas com aplicabilidade diagnóstica, prognóstica e de monitoramento, chamados biomarcadores, tem instigado a ciência atual, pois permitem o desenvolvimento de terapias específicas direcionadas à patogênese do processo a nível molecular (BIELENKOVA e MARTIN, 2004). A identificação de biomarcadores específico para a EM torna o seu diagnóstico mais simples e direto. (FOSSEY et al.,

2007; BRANDLE et al; 2016).

### 3.6 TRATAMENTO

Não existe cura para a EM. O tratamento está assentado em três pontos fundamentais: diminuir a duração do surto, alterar a progressão da doença e amenizar as crises agudas (CRITCHLEY, 2004; GALLUD et al., 2006).

Durante os surtos, o tratamento objetiva reduzir a duração dos sintomas e prevenir as complicações (CRITCHLEY, 2004; GALLUD et al., 2006). Na fase de controle, a modalidade terapêutica depende da situação clínica (PEREIRA et al; 2012). Existem diversos tipos: uso de glicocorticoides ou corticotropina, para barrar os surtos; uso de medicações para tratar os sintomas (antidepressivos, anticonvulsivantes, antiespásticos) e fisioterapia, terapia ocupacional e psicoterapia para tratar as sequelas. Imunomoduladores são usados para alterar o curso clínico da doença, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos portadores (GALLUD et al., 2006; PEREIRA et al; 2012).

Segundo Lana-Peixoto et al. (2002), são as seguintes as drogas e intervenções de eficácia na esclerose múltipla:

#### *3.6.1 Glicocorticoides e corticosteroides*

A literatura é concordante na afirmação de que a metilprednisona acelera a recuperação dos surtos de EM e, atualmente, esse é o tratamento padrão para as fases ativas (LANA-PEIXOTO et al; 2002; PEREIRA et al; 2012). Os corticosteroides podem alterar o curso natural da doença, na forma clínica de surto-remissão, o uso da metilprednisona intravenosa (MPIV) previne ou adia a progressão da incapacidade e, no exame de ressonância magnética, promove o desenvolvimento lento de faixas negras em T1, previne ou adia a atrofia da substância branca e reduz o potencial do gadolínio em T1 (ARAÚJO e FREITAS, 2008).

### *3.6.2 Imunomoduladores*

O uso dos imunomoduladores para o tratamento de pacientes com EM modificou o curso natural da doença (ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA, 2005). Tais quimiocinas, potencializam muitas doenças virais e desempenham papel fundamental na resposta do sistema imune contra vírus e anticorpos que lhe são dirigidos (FRIEDMAN, 2007).

Estas substâncias de prescrição complexa e restrita, alteram a progressão da doença, pois reduzem a frequência e a gravidade dos surtos (HUGUES, 1994). São exemplos de imunomoduladores:

#### *3.6.2.1 Interferon*

O interferon- $\beta$ , sintetizado por fibroblastos e codificado apenas por um gene humano. Eles possuem muitas propriedades comuns e, por isso, são classificados como interferons tipo I (FRIEDMAN, 2007). Preparações de Interferon (IFN) beta 1-a de 30 mcg e 44 mcg, administradas via intramuscular uma vez por semana, e via subcutânea três vezes por semana, respectivamente, são licenciadas para o tratamento de pacientes com a forma clínica surto-remissão de EM (TRABOULSEE et al., 2008; PINA, 2012). De acordo com o protocolo desenvolvido pela Academia Brasileira de Neurologia, justifica-se o uso do interferon- $\beta$  desde o momento do primeiro episódio de desmielinização. (HUGHES, 1994; ANDERSON e GOODKIN, 1996; POLMAN e UITDEHAAG, 2000; CRITCHLEY, 2004; FRAGOSO e FIORE, 2005; VIRLEY, 2005; GALLUD et al., 2006; FRIEDMAN, 2007; SANTOS, YOKOTA, DIAS, 2007; JORDY, TILBERY, FAZZITO, 2008; PEREIRA et al; 2012; PINA, 2012).

#### *3.6.2.2 Acetato de glatirama*

O acetato de glatirama (GA) é um copolímero imunomodulador composto de 4 aminoácidos (ácido glutâmico, lisina, alanina e tirosina), descoberto há cerca de 30 anos

e sintetizado inicialmente para simular componentes imunogênicos da proteína básica da mielina (MPB) (KARANDIKAR et al., 2002). Seu mecanismo de ação se concentra em modificar a inflamação e a desmielinização do SNC, características da EM. (FRAGOSO e FIORE, 2005). Dessa forma, o GA diminui a taxa de surtos e o número de novas lesões em pacientes com a forma remitente-recorrente de esclerose múltipla (KARANDIKAR et al., 2002; AHARONI et al; 2008; PEREIRA et al; 2012).

### *3.6.3 Imunossupressores*

Existem diversos ensaios clínicos que analisam a efetividade de medicamentos imunossupressores convencionais em evitar os surtos ou episódios de agudização da EM (HUGUES, 1994). A possibilidade de tratar a EM com drogas imunossupressoras teve início nos anos 60, diante das observações clínicas e laboratoriais da característica inflamatória da doença. Diante disso, foram incorporados à terapia medicamentos citostáticos e imunossupressores utilizados em outras doenças inflamatórias sistêmicas, tais como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatóide (CALLEGARO et al., 2002). Dentre os imunossupressores aceitos do ponto de vista terapêutico para o tratamento da EM, destacam-se a azatioprina, a ciclofosfamida, o methotrexate, a cladribina, a ciclosporina e o mitoxantrone.

### *3.6.4 Anticorpos monoclonais*

Um dos exemplos de compostos utilizados nesta modalidade terapêutica são os anticorpos humanizados direcionados contra a VLA-4, uma molécula de adesão expressa na superfície de leucócitos, que favorece a sua ligação com a molécula VCAM-1, presente nas células endoteliais. Tais substâncias se mostraram bastante eficazes em diminuir a atividade da EM nas formas surto-remissivas (SELTER et al; 2013; CRISTIANO et al., 2013; KAUFMAN et al; 2014). Adicionalmente, reduzem os níveis séricos de IgG e IgM, quando comparados aqueles submetidos à terapia com corticosteróides e interferon do tipo  $\beta$  (SELTER et al; 2013).

### 3.6.5 Outros Tratamentos

A plasmaférese e o transplante de células-tronco hematopoiéticas. são outras possibilidades terapêuticas. A plasmaférese tem o seu emprego fundamentado no fato de que indivíduos portadores de EM apresentam, no sangue circulante, na fase aguda da doença, complexos imunes (PADILLA-DOCAL et al., 2007). Essa técnica consiste na remoção de citocinas, anticorpos e células, constituintes deflagradoras do episódio de desmielinização, que culmina com o quadro clínico da EM, interferindo, assim, na sua evolução (CALLEGARO et al., 2002).

O transplante de células-tronco hematopoiéticas do tipo autogênico com regimes não mieloablativos embora seja recente, é outra modalidade terapêutica possível para a EM, entretanto, sua indicação não é extensiva a todos os casos (VOLTARELLI, 2010). Indivíduos muito comprometidos pela inaptidão neurológica, com curso progressivo estabelecido, sem recidivas ou atividade inflamatória detectável em RNM, estão contraindicados a participar dessa terapia. Por outro lado, os pacientes que mais se beneficiam com a técnica são aqueles que apresentam a forma maligna da EM, para os quais todas as terapêuticas existentes tenham falhado. Este tratamento reverte a revete a incapacidade na forma ativa da EM (VOLTARELLI, 2010).

## **4 OBJETIVOS**



#### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação do *HLA DRB1\** com os níveis séricos de IgG numa amostra de portadores de esclerose múltipla (EM).

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Descrever a distribuição da frequência dos alelos *HLA-DRB1\** em um grupo de indivíduos portadores de esclerose múltipla (EM).
- 2) Comparar a frequência dos alelos *HLA-DRB1\** com a frequência descrita em doadores voluntários de medula óssea.
- 3) Analisar a possível associação entre a frequência dos alelos *HLA-DRB1\** com as variáveis forma clínica, raça, sexo, idade de diagnóstico, presença ou não de sequela, uso de imunomodulador e níveis séricos de IgG.
- 4) Comparar os níveis séricos de IgG em indivíduos saudáveis e em indivíduos portadores de (EM).
- 5) Analisar a possível associação entre os níveis séricos de IgG com as variáveis forma clínica, raça, sexo, idade de diagnóstico, presença ou não de sequela e uso de imunomodulador.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

O Estado da Bahia, no período correspondente a janeiro de 2008 a março de 2016 apresentou 232 casos de internamento por EM, com destaque para as cidades de Salvador (155 casos), Jequié (14 casos) e Teixeira de Freitas (10 casos), conforme informações disponibilizadas pelo banco de dados do Ministério da Saúde (DATASUS, 2015).

No Hospital das Clínicas da Universidade Federal da Bahia funciona o núcleo de assistência aos portadores de EM oriundos da capital e interior do estado da Bahia. O ambulatório oferece suporte a cerca de 600 indivíduos, oferecendo serviços de diagnóstico e tratamento, tanto medicamentoso como fisioterápico, além do encaminhamento para as outras especialidades que se fizerem necessárias.

### 5.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo foi desenvolvido com delineamento representado na Figura 3.

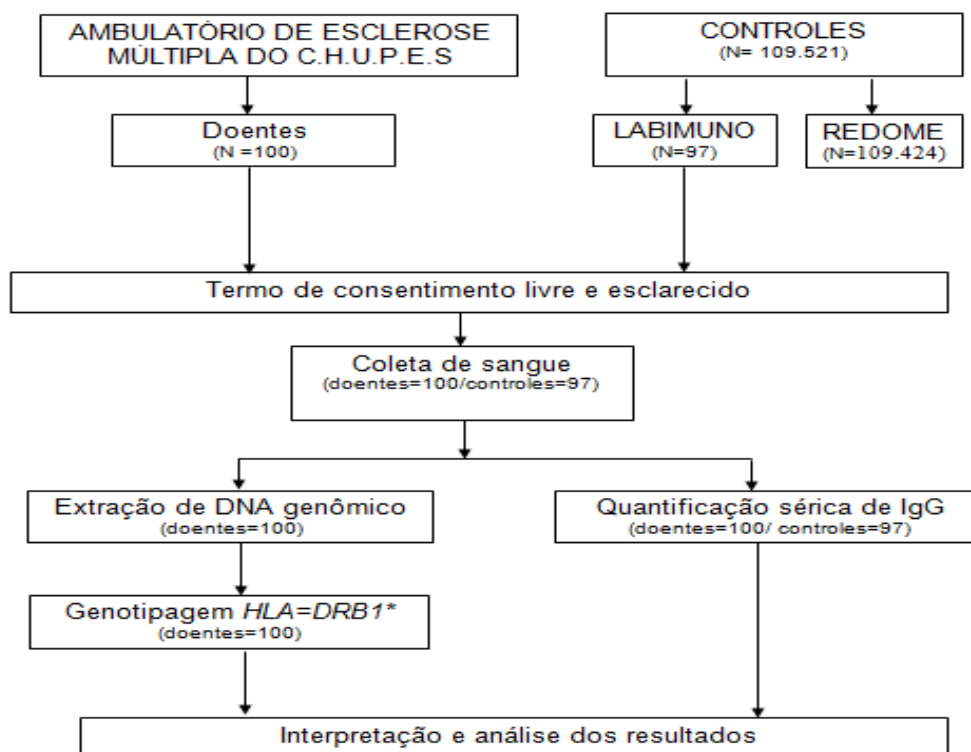


Figura 3 - Delineamento do estudo

## 5.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

No presente estudo, do tipo caso-controle, a amostra foi constituída de 100 indivíduos portadores de EM, atendidos no ambulatório Francisco de Magalhães Neto, do Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia, no período de outubro de 2014 a abril de 2015, com diagnóstico fechado pelos neurologistas do serviço, através de exames de ressonância magnética, testes laboratoriais e avaliação clínica. Para níveis comparativos da quantificação do IgG, uma amostra de 97 indivíduos que procuraram o laboratório de Imunologia da Universidade Federal da Bahia, neste mesmo período foi considerada. Como critério de exclusão para estes indivíduos utilizou-se o relato de condições especiais de saúde tais como gestação, diabetes, hipertensão arterial e cardiopatia. Por fim, a análise das frequências alélicas foi realizada com base em um controle histórico, constituído pelos dados de 109.424 doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, disponibilizado no site Rede Brasil de Imunogenética.

## 5.3 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho foi registrado no CONEP\SISNEP\MINISTÉRIO DA SAÚDE sob a folha de rosto número 073090/2014 (ANEXO A), submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia e aprovado, conforme registro 35171314.0.0000.5577 (ANEXO B). O desenvolvimento desta pesquisa utilizou o Termo de Consentimento Livre e Informado (APÊNDICE A), que teve como objetivo esclarecer os voluntários sobre os riscos da coleta, assegurando-lhe a voluntariedade e a desistência em qualquer momento de participar do estudo sem nenhum ônus para si, bem como o sigilo acerca das informações coletadas.

Todos os pacientes que participaram do estudo foram beneficiados indiretamente pelos avanços obtidos no conhecimento da etiopatogenia da doença e efetividade do tratamento conseguidos pelas informações reunidas neste estudo.

A metodologia foi desenvolvida em duas etapas: FASE DE COLETA e FASE DE ANÁLISE:

#### 5.4. FASE DE COLETA:

##### 5.4.1 Coleta dos dados sócio-clínico-demográficos

Os dados sócio-clínico-demográficos como sexo, idade e raça/etnia, forma clínica da esclerose múltipla, idade de diagnóstico da doença, presença ou não de sequelas e medicação imunomodulatória em uso, foram obtidos pela aplicação de questionário pré elaborado especialmente para esta pesquisa (APÊNDICE B), após a assinatura do termo de consentimento livre e informado (APÊNDICE A).

##### 5.4.2 Coleta do sangue

Aproximadamente 18 ml de sangue venoso periférico oriundo da veia cefálica, foi colhido de cada participante do estudo, e distribuído em dois tubos: 10,0 mL em tubo sem ativador de coágulo, de onde seria extraído o soro para a dosagem da IgG; 8,0 mL em tubo preparado com EDTA, para a extração do *buffy-coat*, matéria prima para realizar a genotipagem. Esta colheita foi realizada por uma técnica de enfermagem experiente, amplamente treinada através da técnica à vácuo. Nos casos de veias muito finas, o sangue foi coletado via escalpe e seringas a partir da veia dorsal do metacarpo.

Ao final de cada dia de coleta as amostras foram conduzidas ao Anexo 2 do Laboratório de Imunologia para serem processadas e armazenadas. Microtubos do tipo Eppendorf com 2,5 ml de capacidade, foram utilizados para o armazenamento.

Os tubos contendo o material coletado de 10 ml foram centrifugados por 15 minutos a 5000 RPM. Feito isso, o soro e o halo de leucócitos (*buffy-coat*) foram transferidos para os microtubos para armazenamento e congelamento em freezer a –70°C.

## 5.5 FASE DE ANÁLISE

Antes de se proceder a esta fase, as amostras foram retiradas do freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  e deixadas descongelar à temperatura ambiente.

### 5.5.1 GENOTIPAGEM *HLA-DRB1* \*

#### 5.5.1.1 Extração e Purificação do DNA

O processo de extração do DNA foi realizado com o uso do kit GENOMIC DNA - INVITROGEN®, segundo as instruções do fabricante.

200  $\mu\text{l}$  da amostra de *buffy-coat*, previamente descongelada foi dispensada em microtubo e acrescida de 20  $\mu\text{L}$  de proteinase, e 20  $\mu\text{L}$  de RNase. Essa mistura foi homogeneizada por 5 segundos, e então, deixada à temperatura ambiente por 2 minutos. Transcorrido este tempo, acrescentou-se ao recipiente 200  $\mu\text{l}$  de solução tampão lise e então incubou-se a mistura à  $55^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Completada a incubação, procedeu-se nova homogeneização, também por 5 segundos. Em seguida, acresceu-se ao conteúdo do microtubo 200  $\mu\text{l}$  de etanol a  $96^{\circ}$ . Após nova homogeneização novamente por 5 segundos, todo o conteúdo do microtubo foi transferido para um novo tubo coletor com coluna e centrifugado à 10.000 rpm, à temperatura ambiente, por 1 minuto. Após centrifugação, descartou-se o filtrado do tubo coletor; acrescentou-se ao conjunto coluna + tubo coletor 500  $\mu\text{l}$  de solução tampão 1 e procedeu-se nova centrifugação à 10.000 rpm, à temperatura ambiente, por 1 minuto. Feito isso, descartou-se novamente o filtrado, acrescentou-se 500  $\mu\text{l}$  de solução tampão 2, e procedeu-se nova centrifugação, agora à 13.000 rpm, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Então, o tubo coletor foi descartado, juntamente com seu conteúdo, e a coluna transferida para um novo tubo coletor. Por fim, diluiu-se a amostra com 50  $\mu\text{l}$  de tampão eluição, incubou-se à temperatura ambiente por 1 minuto e após centrifugação à 13.000 rpm, por 1 minuto à temperatura ambiente.

### 5.5.1.2 Quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA

O DNA genômico obtido foi quantificado pela determinação de densidade óptica com o espectrofotômetro *Thermo Scientific Multiskan Go*, no comprimento de onda de 260 nm. Considerou-se a razão de absorbância 260/230 para sais orgânicos e 260/280 para proteínas. Aquelas amostras cujos valores da razão 260nm\280nm situaram-se entre 1,5 e 1,7 (ou seja, uma amostra de boa qualidade e livre de contaminação) e cujas concentrações apresentavam-se acima de 20 mg/mL foram usadas para a genotipagem. Após a quantificação de DNA, as amostras foram guardadas a -20°C até seu uso.

### 5.5.1.3 Genotipagem *HLA-DRB1*\*

Foi utilizado o Kit One lambda Incorporation –“HLA-DR SSO Genotyping Test” para genotipagem em baixa resolução do *HLA-DRB1*\*. Esse kit possui *primers locus* específicos e sondas de oligonucleotídeo específicas imobilizadas em microesferas para identificação dos alelos.

#### 5.5.1.3.1 Amplificação do DNA genômico

Para cada amostra foi realizada uma reação de PCR para o *HLA-DRB1*\*. Em cada poço teste da placa de PCR foi adicionado 6,9 µL de solução D-Mix (contendo DNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, TrisHCl) , 2 µL do *primer* exon específico, 0,1 µL de Taq polimerase e 1µL de DNA. A placa foi selada com filme termo-resistente e colocada no termociclador o qual foi previamente programado com os seguintes parâmetros: 6 ciclos de 96°C por 200 segundos, 5 ciclos de 60°C por 20 segundos, 5 ciclos de 72°C por 20 segundos, 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 30 ciclos de 60°C por 15 segundos, 30 ciclos de 72°C por 20 segundos, um ciclo de 72°C por 10 minutos e um ciclo final de 4°C, também por 10 minutos.

#### 5.5.1.3.2 Eletroforese do DNA amplificado

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 1,5% era preparado com 0,45g de agarose (Invitrogen), 30 mL de tampão TBE 1X (Tris-borato 89mM, EDTA 2mM pH 8,0) e 0,05 µg/mL de brometo de etídio. O gel foi recoberto com 10,0 mL de TBE 1X contendo 0,05 µg/mL e adicionado 1,5 µL de cada reação de PCR no poço correspondente. A corrida eletroforética foi realizada a 140-150 V com 40mA durante 10 minutos.

#### 5.5.1.3.3 Hibridização para Genotipagem

Utilizando nova placa de PCR, foi adicionado 2,5 µL do DNA amplificado, 1,25 µL do tampão de desnaturação e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi acrescentado o tampão de neutralização e a placa colocada em banho de gelo. As microesferas com sondas alelos específicas biotinizadas diluídas 1/32 com tampão de hibridização foram adicionadas e a placa foi incubada a 60°C por 15 minutos. Em seguida, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem presente no kit. Após as referidas lavagens foi adicionado streptavidina conjugada com R-ficoeritrina (SAPE) diluído 1/100, a placa foi incubada por 5 minutos a 60°C, feita uma lavagem com o tampão e realizada a leitura no equipamento LABScan Luminex®. O resultado da leitura foi analisado utilizando o software HLA-Visual fornecido pelo fabricante do material utilizado.

### 5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IgG

A quantificação dos níveis séricos de IgG foi realizada por nefelometria, um procedimento automatizado com uso do equipamento IMMAGE® (BECKMAN COULTER, 2010). Esta técnica é indicada para a detecção de antígenos solúveis e tem como fundamento o aumento da taxa de dispersão da luz causada por partículas em suspensão numa solução, como resultado da formação de complexos antígeno-



anticorpo. Após todos os volumes de reagentes serem carregados no aparelho, o sistema calcula a turbidez da amostra e emite o resultado da concentração de IgG no soro em mg/dL. Os valores do intervalo de referência para a IgG sérica humana foram determinados pelo sistema Array® 360, que considera dentro dos padrões de normalidade concentrações de IgG sérico entre 650-1600 mg/dL (BECKMAN COULTER, 2010).

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes às informações sócio-clínico-demográficas, de genotipagem *HLA-DRB1\** e de níveis séricos de igG foram armazenados em banco de um pacote de análise estatística, o *software* IBM SPSS STATISTICS 22 para Windows e foram submetidos a testes estatísticos para cálculo das frequências simples e da associação entre as variáveis com poder de confiança de 95%.

Foram realizadas análises descritivas das informações obtidas, demonstrando-se frequências relativas e absolutas das características clínico-sócio-demográficas, prevalências dos grupos alélicos, prevalência, média e desvio-padrão dos níveis séricos de IgG.

O teste exato de Fischer foi utilizado para verificar as possíveis associações das variáveis qualitativas, assumindo-se um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## **6 RESULTADOS**

## 6.1 Caracterização da amostra de estudo

O presente estudo, do tipo CASO-CONTROLE, incluiu, após assinatura do TCLE, 120 indivíduos portadores de esclerose múltipla (EM) atendidos no ambulatório Francisco de Magalhães Neto, do Hospital Universitário da Universidade Federal da Bahia, no período de outubro de 2014 a abril de 2015. Destes, 20 foram excluídos com base na quantidade de amostras de sangue conseguidas. Desta forma, a população de estudo foi constituída de 100 portadores de EM. A seguir, a tabela 1 com os dados sócio-clínico-demográficos

**Tabela 1** – Número e proporção de portadores de esclerose múltipla (EM) (N=100), de acordo com as variáveis sócio-clínico-demográficas.

VARIÁVEL	%	N
<b>Sexo</b>		
Feminino	83	83
Masculino	17	17
<b>Raça</b>		
Branca	25	25
Negra/Parda	75	75
<b>Faixa etária</b>		
≤ 19 anos	4	4
20-29 anos	21	21
30-39 anos	28	28
40-49 anos	26	26
≥ 50 anos	21	21
<b>Idade de diagnóstico da EM</b>		
≤ 19 até 29 anos	45	45
30 até ≥ 50 anos	55	55
<b>Forma clínica da EM</b>		
Surto – remissão	76	76
Progressivas	24	24
<b>Sequelas</b>		
Não	70	70
Uma ou mais sequelas	30	30
<b>Medicação específica para EM</b>		
Não	7	7
Interferons (IFN-β1-b ou IFN-β1-a)	58	58
Acetato de glatirama	28	28
Natalizumab	4	4
<b>Níveis séricos de IgG</b>		
650-1600 mg/dL	75	75
>1600 mg/dL	25	25
<b>TOTAL</b>		<b>100</b>

n= número de indivíduos; % = Frequência relativa de indivíduos.

A população do estudo foi composta de 100 indivíduos portadores de EM, com predominância do sexo feminino (83,0%), da raça negra ou parda (75%) com idade de

30 a 39 anos (29,3%). Grande parte da amostra (55%), teve o diagnóstico da doença estabelecido a partir dos 30 anos de idade (55,0%), sendo que a maior parte destes (76,0%) enquadrou-se na forma mais branda da EM, a surto-remissiva, com ausência de sequela clínica (70,0%). A maioria dos doentes (58,0%), relatou fazer uso de Interferons para o controle da EM e não apresentavam elevação nos níveis séricos de IgG (76,0%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na composição dos subgrupos “Raça branca” e “Raça negra ou parda” em relação às variáveis: sexo; faixa etária, idade de diagnóstico da doença, presença ou ausência de sequela e medicação em uso para o tratamento da EM.

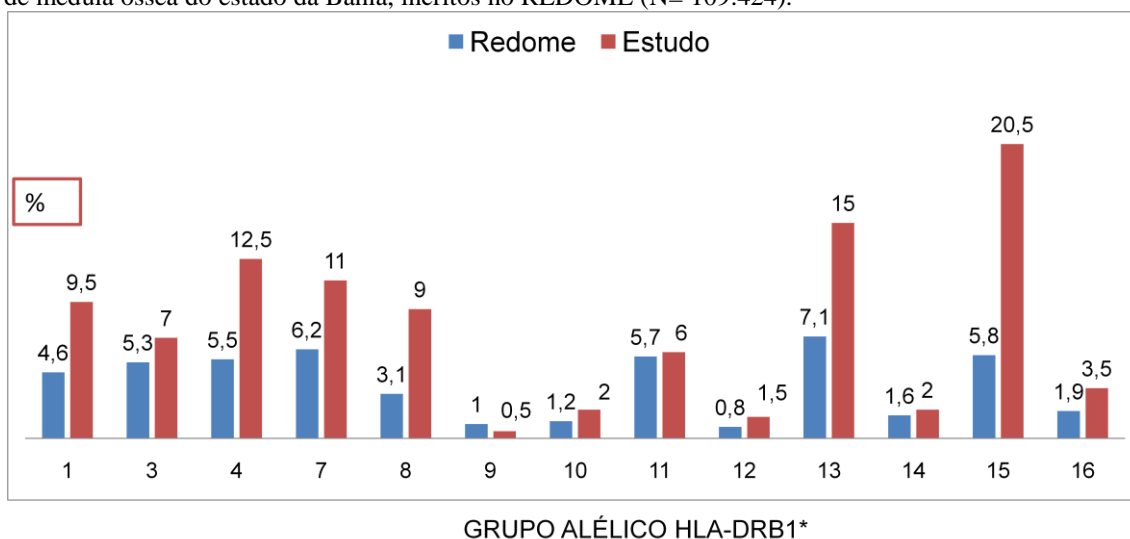
A tabela 2 e o gráfico 1, mostram a frequência dos grupos alélicos encontrados nos grupos caso e controle, a seguir.

**Tabela 2-** Frequência dos alelos *HLA-DRBI\** em portadores de EM (N=100) e nos doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, inscritos no REDOME (N= 109.424).

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRBI*</i>	REDOME, 2016		ESTUDO		P
	<u>Grupo controle</u>		<u>Grupo caso</u>		
	N	%	N	%	
<b>01</b>	10.260	4,6	19	9,5	0,93
<b>03</b>	11.781	5,3	14	7,0	0,08
<b>04</b>	12.215	5,5	25	12,5	0,50
<b>07</b>	13.756	6,2	22	11,0	0,59
<b>08</b>	6.987	3,1	18	9,0	0,14
<b>09</b>	2.206	1,0	01	0,5	0,19
<b>10</b>	2.744	1,2	04	2,0	0,82
<b>11</b>	12.490	5,7	12	6,0	<b>0,01*</b>
<b>12</b>	1.886	0,8	03	1,5	1,0
<b>13</b>	15.713	7,1	30	15	0,76
<b>14</b>	3.527	1,6	04	2,0	0,42
<b>15</b>	12.723	5,8	41	20,5	<b>&gt; 0,01*</b>
<b>16</b>	3.136	1,9	07	3,5	0,52
Total	<b>109.424</b>		<b>100</b>		

<sup>1</sup>N = número de indivíduos ; <sup>2</sup>%= Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup>p= Significância estatística. Valores significantes: p≤0,05

**Gráfico 1-** Frequência dos alelos *HLA-DRB1\** em portadores de EM (N=100) e nos doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, inscritos no REDOME (N= 109.424).



Todos os grupos alélicos do gene *HLA-DRB1\** foram identificados nos portadores de EM, sendo os mais frequentes o *HLA-DRB1\*15* (20,5%), *HLA-DRB1\*13* (15%), *HLA-DRB1\*04* (12,5%), *HLA-DRB1\*07* (11,0%) e *HLA-DRB1\*01* (9,5%). A família dos alelos *HLA-DRB1\*10*, *HLA-DRB1\*12* e *HLA-DRB1\*09* foram os grupos que apresentaram menores prevalências com 2,0%, 1,5 % e 0,5 %, respectivamente. Para a população baiana de modo geral, representada pelos doadores voluntários de medula óssea do estado da Bahia, os alelos mais frequentes foram *HLA-DRB1\*13* (7,1%); *HLA-DRB1\*07* (6,2%) e *HLA-DRB1\*15* (5,8%).

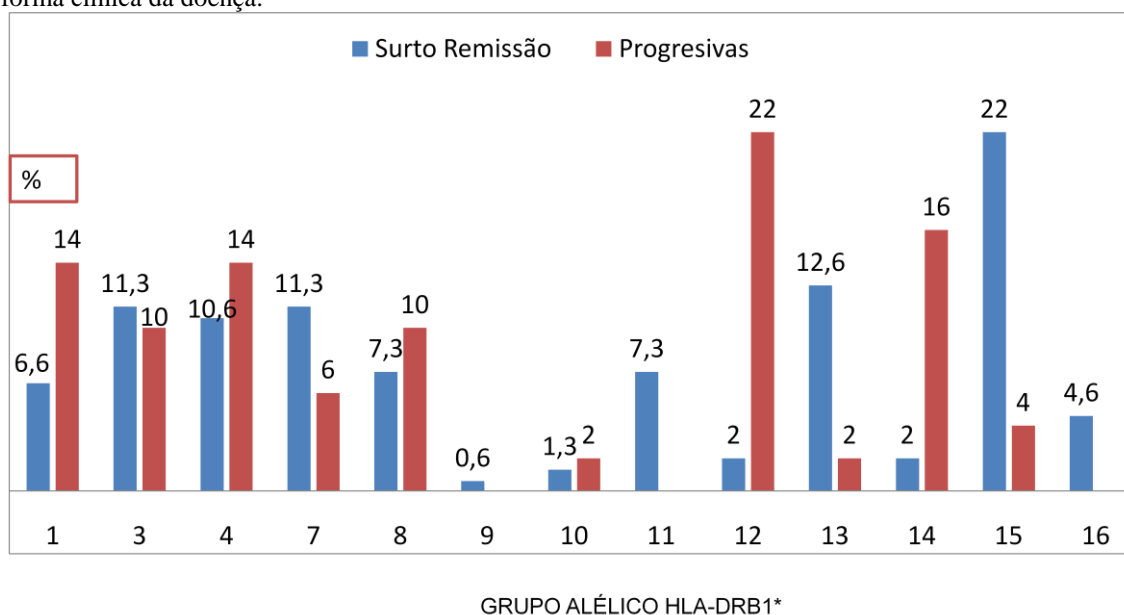
Abaixo, a tabela 3 e o gráfico 2 mostram a frequência de portadores de EM que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1\**, organizada segundo a forma clínica da EM.

**Tabela 3-** Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a forma clínica da doença.

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRB1</i> *	Forma Clínica				$p^3$
	Surto Remissão		Progressivas		
	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	
01	10	6,6	07	14,0	
03	17	11,3	05	10,0	0,75
04	16	10,6	07	14,0	0,78
07	17	11,3	03	6,0	0,79
08	11	7,3	05	10,0	0,26
09	01	0,6	-	-	0,76
10	02	1,3	01	2,0	-
11	11	7,3	-	-	1,0
12	03	2,0	11	22,0	> 0,01*
13	19	12,6	01	2,0	0,02*
14	03	2,0	08	16,0	> 0,01*
15	33	22,0	02	4,0	0,01*
16	07	4,6	-	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> n = número de alelos ; <sup>2</sup> %= Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup> p= Significância estatística. Valores significantes:  $p \leq 0,05$ .

**Gráfico 2-** Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM \* (N=100), organizada segundo a forma clínica da doença.



Dentre os doentes que desenvolveram uma das formas progressivas de EM, os alelos *HLA-DRB1*\*12 e *HLA-DRB1*\*14 foram os mais prevalentes com frequências de 22,0% e 16,0% respectivamente. Por outro lado, para os portadores da forma clínica surto-remissiva, os alelos *HLA-DRB1*\*15 (22,0%) e *HLA-DRB1*\*13 (12,6%) foram mais prevalentes.

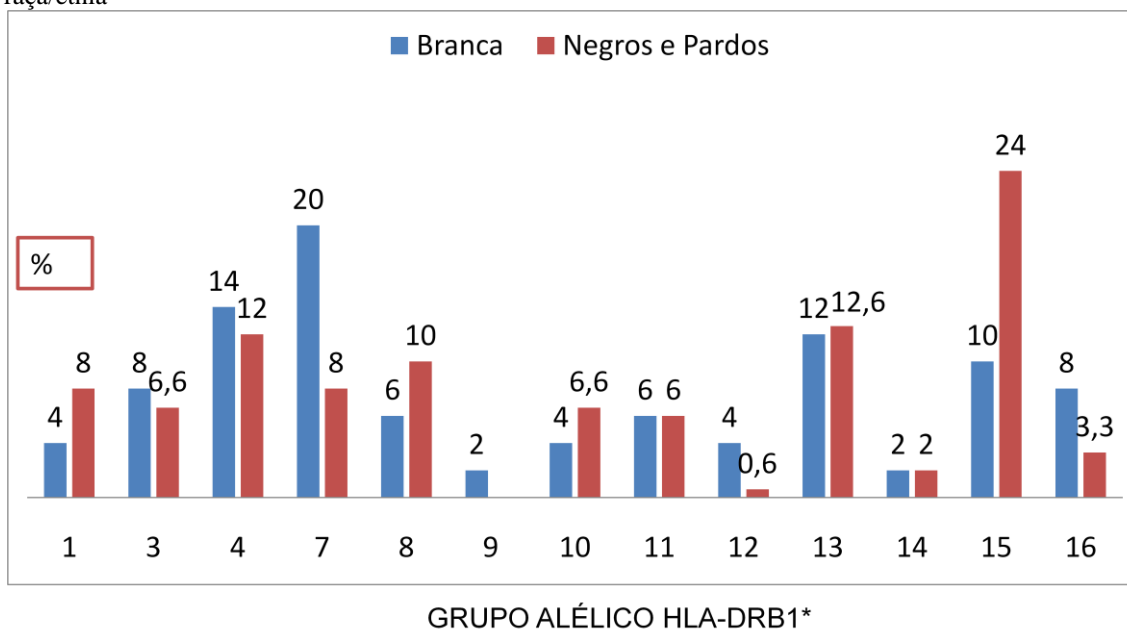
A tabela 4 e o gráfico 3, abaixo, mostram a frequência dos portadores de EM que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1*\* (N=100), organizada segundo a raça/etnia.

**Tabela 4-** Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a raça/etnia

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRB1</i> *	Raça/Etnia		Negros e Pardos		<i>p</i> <sup>3</sup>
	Branca		n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	
<i>01</i>	2	4,0	12	8,0	0,57
<i>03</i>	4	8,0	10	6,6	0,74
<i>04</i>	7	14,0	18	12,0	0,79
<i>07</i>	10	20,0	12	8,0	<b>0,02*</b>
<i>08</i>	3	6,0	15	10,0	0,54
<i>09</i>	1	2,0	-	-	-
<i>10</i>	2	4,0	10	6,6	0,54
<i>11</i>	3	6,0	09	6,0	1,0
<i>12</i>	2	4,0	01	0,6	0,15
<i>13</i>	6	12,0	19	12,6	0,31
<i>14</i>	1	2,0	03	2,0	1,0
<i>15</i>	5	10,0	36	24,0	<b>0,01*</b>
<i>16</i>	4	8,0	05	3,3	0,22
<b>TOTAL</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> n = número de alelos ; <sup>2</sup> %= Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup> p= Significância estatística. Valores significantes:  $p \leq 0,05$ .

**Gráfico 3** - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada segundo a raça/etnia



Nos indivíduos negros e pardos da amostra estudada houve maior ocorrência dos alelos *HLA-DRB1\*15* (24,0%) e *HLA-DRB1\*07* (8,0%). Por outro lado, nos brancos, destaque na frequência dos alelos *HLA-DRB1\*07* (20,0%) e *HLA-DRB1\*04* (14,0%).

A análise da frequência alélica em função da variável sexo não mostrou associações significantes.

A EM é uma doença que acomete preferencialmente mulheres mais jovens. Diante desta característica, optou-se em agrupar os indivíduos do estudo em dois grupos: aqueles cujo diagnóstico da EM ocorreu nas fases iniciais da vida, ou seja, antes dos 29 anos de idade; e aqueles acometidos pela doença nas fases mais avançadas da vida, com diagnóstico firmado dos 30 anos em diante. A seguir, relacionadas na tabela 5 e no gráfico 4, a frequência de portadores de EM, que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1\**, organizada segundo a idade de diagnóstico da EM.

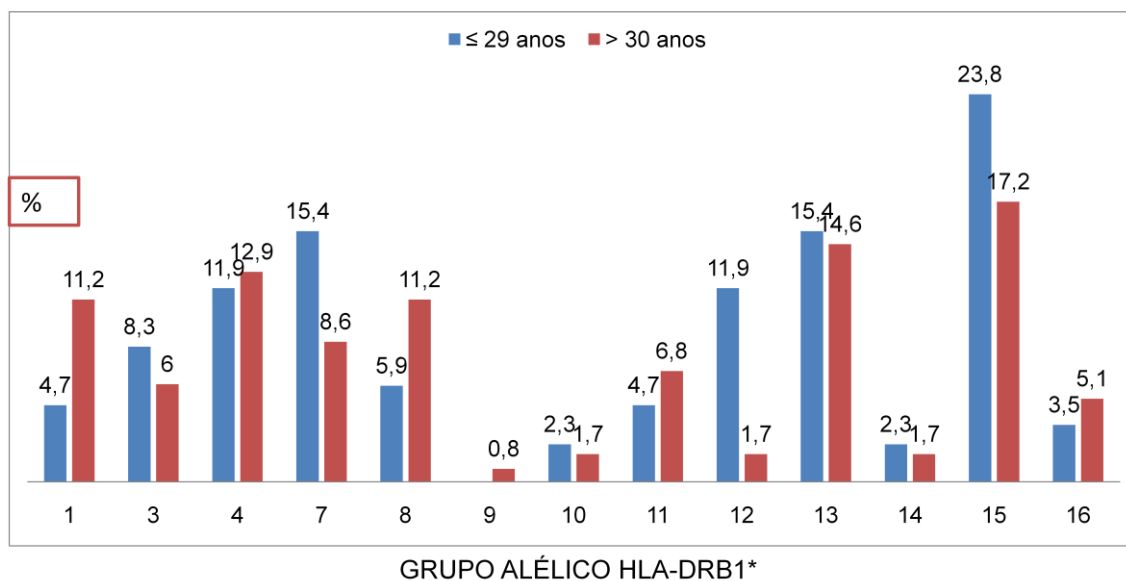
Tabela 5 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1\** nos portadores de EM \* (N=100), organizada segundo a idade de diagnóstico da EM

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRB1*</i>	Idade de Diagnóstico				<i>p</i> <sup>3</sup>
	≤ 29 anos		> 30 anos		
	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	
<i>01</i>	04	4,7	13	11,2	0,11
<i>03</i>	07	8,3	07	6,0	0,56
<i>04</i>	10	11,9	15	12,9	1,0
<i>07</i>	13	15,4	10	8,6	0,087
<i>08</i>	05	5,9	13	11,2	0,19
<i>09</i>	-	-	01	0,8	-
<i>10</i>	02	2,3	02	1,7	1,0
<i>11</i>	04	4,7	08	6,8	0,75
<i>12</i>	01	11,9	02	1,7	1,0
<i>13</i>	13	15,4	17	14,6	1,0
<i>14</i>	02	2,3	02	1,7	1,0
<i>15</i>	20	23,8	20	17,2	0,15
<i>16</i>	03	3,5	06	5,1	0,73
<b>TOTAL</b>	<b>84</b>	<b>100</b>	<b>116</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> n = número de alelos ; <sup>2</sup> %= Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup> p= Significância estatística. Valores significantes: p≤0,05.



Gráfico 4 - Frequência de portadores de EM, que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1\** (N=100), organizada segundo a idade de diagnóstico da EM



O alelo *HLA-DRB1\*15* foi o mais prevalente tanto nos doentes com idade de diagnóstico precoce (23,8%), como naqueles cujo diagnóstico ocorreu em idades mais avançadas (17,2%). O alelo *HLA-DRB1\*09* foi expresso apenas nos indivíduos que manifestaram a doença em idades mais avançadas.

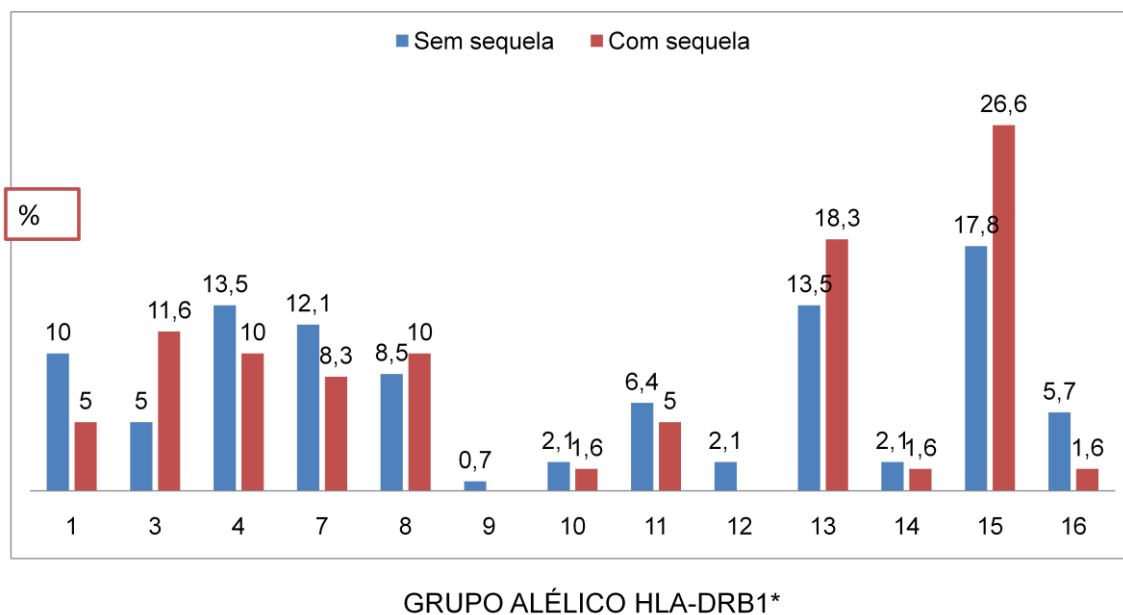
A Tabela 6 e o gráfico 5, abaixo, mostram a frequência de portadores de EM, que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1\** organizada de acordo com a gravidade da doença.

Tabela 6 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com a gravidade da doença

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRB1</i> *	SEQUELA				$p^3$
	Sem sequela		Com sequela		
	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	
01	14	10,0	03	5,0	0,26
03	07	5,0	07	11,6	0,11
04	19	13,5	06	10,0	0,61
07	17	12,1	05	8,3	0,44
08	12	8,5	06	10,0	0,77
09	01	0,7	-	-	-
10	03	2,1	01	1,6	1,0
11	09	6,4	03	5,0	1,0
12	03	2,1	-	-	-
13	19	13,5	11	18,3	0,35
14	03	2,1	01	1,6	1,0
15	25	17,8	16	26,6	0,12
16	08	5,7	01	1,6	0,27
<b>TOTAL</b>	<b>140</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> n = número de alelos ; <sup>2</sup> %= Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup> p= Significância estatística. Valores significantes:  $p \leq 0,05$ .

Gráfico 5- Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com a gravidade da doença



A distribuição dos alelos *HLA-DRB1*\* segundo a gravidade da EM, medida pela presença ou não de sequela revelou que independentemente da presença ou não de sequela o alelo *HLA-DRB1*\*15 foi o mais prevalente. Por outro lado, naqueles indivíduos que não relataram sintoma residual, os alelos *HLA-DRB1*\*04 (13,5%) e

*HLA-DRB1\*13* (13,5%) se destacaram. Os alelos *HLA-DRB1\*09* e *HLA-DRB1\*12* não foram registrados dentre os portadores de alguma sequela.

A análise dos níveis séricos de IgG bem como das características dos grupos caso e controle podem ser evidenciadas na tabela 7.

Tabela 7 - Características do grupo de portadores de EM (N=100) , do grupo controle (N=97) e percentual de indivíduos por níveis séricos de IgG

GRUPO	IDADE (anos)	SEXO				RAÇA				IgG sérico (mg/dL)			
		Feminino		masculino		Branca		negro /pardo		650-1.600		> 1.600	
		n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>
<b>EM (N=100)</b>	39 ± 11	83	83,0	17	17,0	25	25,0	75	75,0	75	75,0	25	25,0
<b>Sadios (N=97)</b>	41 ± 16	69	70,4	29	29,5	05	5,1	93	94,8	25	25,5	73	74,5
	<i>p</i> <sup>3</sup>	0.043				0.0001				0.065			

<sup>1</sup>n = número de indivíduos ; <sup>2</sup>% = Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup>p= Significância estatística. Valores significantes: p≤0,05.

A média dos níveis séricos de IgG entre os portadores de EM foi de 1.410 ± 323 mg/dL; já no grupo de indivíduos controles, a média encontrada foi de 1.532 ± 310 mg/dL. Maiores percentuais de indivíduos do grupo controle apresentaram elevação nos níveis desta imunoglobulina, quando comparados aos portadores de EM

A Tabela 8, a seguir, mostra os achados clínico-laboratoriais dos portadores de EM

Tabela 8 - Dados clínico-laboratoriais dos portadores de EM

	NÍVEIS SÉRICOS DE IgG (mg/dL)				TOTAL	$p^3$
	650-1.600		>1.600			
	$n^1$	% <sup>2</sup>	$n^1$	% <sup>2</sup>		
<b>Sexo</b>						0,06
Masculino	16	94,0	1	6,0	<b>17</b>	
Feminino	59	71,0	24	29,0	<b>83</b>	
<b>Raça/Etnia</b>						0,31
Branços	19	76,0	9	24,0	<b>25</b>	
Negros/Pardos	56	74,6	16	25,4	<b>75</b>	
<b>Forma clínica</b>						0,29
Surto-remissão	54	71,0	22	28,9	<b>76</b>	
Progressivas	20	83,3	04	16,6	<b>24</b>	
<b>Presença de sequela</b>						0,80
Não apresenta sequela	53	75,7	17	24,2	<b>70</b>	
Presença de uma ou mais sequelas	22	73,3	8	26,6	<b>30</b>	
<b>Idade de Diagnóstico</b>						> 0,01*
< 19-29 anos	27	60,0	18	40,0	<b>45</b>	
30- >50 anos	48	87,2	07	12,7	<b>55</b>	
<b>Imunomodulador em uso</b>						0.035*
Interferon	38	65,5	20	34,4	<b>58</b>	
Acetato de glamatirama	25	89,2	03	10,7	<b>28</b>	

<sup>1</sup>n = número de indivíduos ; <sup>2</sup>% = Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup>p = Significância estatística. Valores significantes:  $p \leq 0,05$ .

Dentre os indivíduos da amostra que apresentaram alteração no níveis séricos de IgG, a maior parte deles referiu o diagnóstico precoce da doença (40,0%) e uso de imunomodulador do tipo Interferon (34,4%).

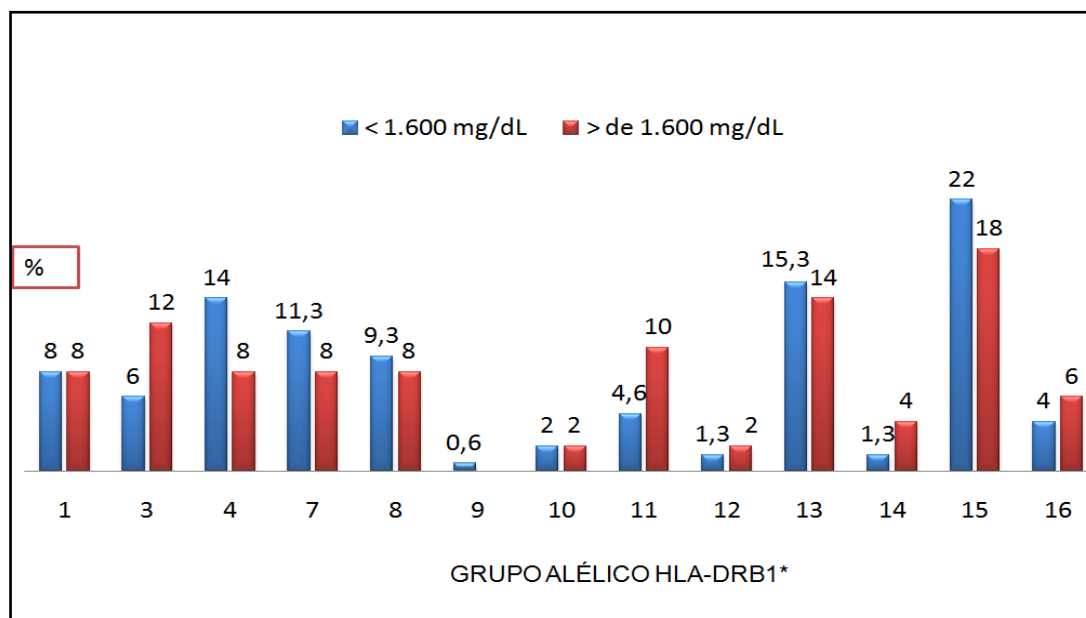
A seguir, a tabela 9 e o gráfico 6 traz a frequência de portadores de EM que apresentaram algum alelo *HLA-DRB1\** (N=100), organizada de acordo com os níveis séricos de IgG.

Tabela 9 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com os níveis séricos de IgG

GRUPO ALÉLICO <i>HLA-DRB1</i> *	NÍVEIS SÉRICOS DE IgG (mg/dL)				<i>p</i> <sup>3</sup>
	650 - 1.600		≥1.600		
	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	n <sup>1</sup>	% <sup>2</sup>	
<i>01</i>	12	8,0	04	8,0	1,0
<i>03</i>	09	6,0	06	12,0	0,21
<i>04</i>	21	14,0	04	8,0	0,33
<i>07</i>	17	11,3	04	8,0	0,60
<i>08</i>	14	9,3	04	8,0	1,0
<i>09</i>	01	0,6	-	-	-
<i>10</i>	03	2,0	01	2,0	1,0
<i>11</i>	07	4,6	05	10,0	0,17
<i>12</i>	02	1,3	01	2,0	1,0
<i>13</i>	23	15,3	07	14,0	1,0
<i>14</i>	02	1,3	02	4,0	0,26
<i>15</i>	33	22,0	09	18,0	0,68
<i>16</i>	06	4,0	03	6,0	0,69
<b>TOTAL</b>	<b>150</b>	<b>100</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	

<sup>1</sup> n = número de alelos ; <sup>2</sup> % = Frequência relativa de indivíduos; <sup>3</sup> p = Significância estatística. Valores significantes:  $p \leq 0,05$ .

Gráfico 6 - Frequência dos alelos *HLA-DRB1*\* nos portadores de EM (N=100), organizada de acordo com os níveis séricos de IgG



A análise da frequência alélica segundo os níveis séricos de IgG demonstra que não houve associação entre as variáveis. Apesar disso, maiores prevalências dos alelos *HLA-DRB1*\* *03* (12,0%) e *HLA-DRB1*\* *11* (10,0%) foram registradas nos indivíduos

com alteração do IgG. Por outro lado, o alelo *HLA-DRB1\*09* foi encontrado apenas nos indivíduos com IgG dentro dos padrões fisiológicos.

## **7 DISCUSSÃO**

A distribuição alélica da população estudada revelou um perfil genotípico do tipo *HLA-DRB1\*15*, seguido do grupo alélico *HLA-DRB1\*13* e do grupo alélico *HLA-DRB1\*04*. Este achado vai de encontro ao perfil genotípico da população baiana de modo geral, disponibilizado no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME 2016), no site Rede Brasil de Imunogenética, onde até 2015, para o estado da Bahia, o alelo *HLA-DRB1\*13* registrou uma frequência relativa de 0,14360, sendo portanto o grupo alélico mais prevalentemente associado a população baiana. Ainda para estes indivíduos, o segundo grupo alélico mais frequente foi o *HLA-DRB1\*07*, com frequência relativa de 0,12571 e o alelo *HLA-DRB1\*11* cuja frequência relativa atribuída foi de 0,11414. Os achados apresentados neste trabalho sugerem fortemente a associação entre *HLA-DRB1\** e EM no estado da Bahia, conforme relatado por Brum et al (2007) em São Paulo, Paradella et al (2014) no Rio de Janeiro e Grzesiuk (2006).

Nos estudos de associação entre HLA e alguma doença é imprescindível que o grupo controle seja obtido da mesma população dos pacientes, pois a frequência dos alelos de HLA varia entre os diferentes grupos étnicos. (REZENDE e ARRUDA, 1996). Em função disso, optou-se pela comparação dos resultados encontrados com os resultados do perfil genotípico do *HLA-DRB1\** para a população baiana, disponibilizados no no Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME, 2016), no site Rede Brasil de Imunogenética. Até o ano de 2015, o Cadastro Nacional de Doadores de Medula Óssea registrou a inclusão de 109.424 doadores voluntários deste órgão no estado da Bahia. Para ser doador voluntário é necessário ter entre 18 e 55 anos de idade e não pode apresentar doença preexistente. Em função das características similares aos doentes envolvidos no estudo, os dados dessa população foram utilizados como controle histórico na análise das frequências alélicas.

Para compreender os estudos de associação entre o complexo MHC classe II e as doenças auto imunes tais como a EM, no Brasil, é necessário retroceder ao período da colonização deste país, nos anos de 1500 a 1800, quando povos de diferentes origens vieram para o Brasil ao mesmo tempo. A composição molecular genética da população brasileira é resultado do cruzamento de imigrantes advindos de diversas regiões da Europa e África, e apesar de aproximadamente 3 milhões de imigrantes africanos, oriundos de diferentes tribos e regiões, cujo grupo alélico predominante é o *HLA-DRB1\*03*, terem sido deslocados para o território brasileiro, o que justifica a grande contribuição deste grupo étnico para a composição genômica da população brasileira, as



altas prevalências encontradas para o grupo *HLA-DRB1\*15*, no estudo em questão, são um legado genético da contribuição europeia na constituição da populacional brasileira, que migraram para o país durante o período da corrida imperialista.

As baixas prevalências do grupo alélico *HLA-DRB1\*09* encontradas neste estudo, sugere que este alelo figura como fator de proteção para a doença além de confirmar a hipótese etiológica dos alelos múltiplos na sua etiologia (DYMENT et al; 2005). Estas evidências sugerem que os produtos de diferentes genes podem aumentar ou diminuir a susceptibilidade para a EM.

A associação entre a forma surto-remissiva e os alelos *HLA-DRB1\*13* e *HLA-DRB1\*15* e das formas progressivas com os alelos *HLA-DRB1\*12* e *HLA-DRB1\*14*, sugere que a prevalência dos alelos *HLA-DRB1\** pode influenciar no curso clínico natural da EM, bem como no grau de incapacidade que ela determina no indivíduo. Maiores frequências da família *HLA-DRB1\*08*, em especial, revelam uma menor tendência de evolução da forma surto-remissiva para as progressivas (BALNYTE et al., 2015). Aliado a isso, o fato de a EM possuir peculiaridades do ponto de vista clínicas tais como idade avançada de acometimento, alta prevalência em mulheres e sintoma inicial sensorial na maioria das vezes, confirmam a hipótese da auto imunidade (SACHDEV et al., 2011). A associação entre os alelos *HLA-DRB1\*13* e *HLA-DRB1\*15* com as formas benignas da EM sustentam a hipótese de que existe uma forte associação entre esse último alelo e o polimorfismo no gene PTPN22 1858T, o que causa o bloqueio das enzimas caspases, promovendo ativação de linfócitos T de maneira desordenada (LARONI et al; 2016). Elevada ocorrência deste fenótipo tem sido relacionada a diversas desordens autoimunes, tais como o pênfigo vulgar e esclerose sistêmica (SACHDEV et al., 2011). Este gene pode estar associado a tendência genética para o desenvolvimento de formas específicas da EM.

Portadores de EM das raças branca e mulata tendem a apresentar maiores prevalências dos alelos *HLA-DRB1\*15* do que os controles da mesma raça (SANTOS et al; 2002; ALVES-LEON et al; 2007; GRZESIUK, 2011), indicando que este alelo pode estar associado à susceptibilidade da EM em diferentes padrões étnicos.

A avaliação do perfil alélico segundo a raça/etnia realizada neste estudo permite inferir que ao se associar o perfil alélico com risco em desenvolver a EM, os afro-descendentes apresentavam uma susceptibilidade que dependia de sua composição

alélica, predominantemente *HLA-DRB1\*15* e *HLA-DRB1\*07*. Diante do que foi exposto, pôde-se perceber que as características clínico-epidemiológicas e genéticas da EM variam muito de um local para outro e isto pode ser explicado pela natureza miscigenada do perfil genético da população brasileira, que influencia na resistência\susceptibilidade por parte desta população em desenvolver EM. Aliado a isso, geograficamente, o Brasil possui características bastantes distintas daqueles países com alta (América do norte; Europa) e baixa (África; Ásia) prevalência da doença.

A análise da distribuição dos grupos alélicos *HLA-DRB1\** segundo o sexo não indicou associação entre as variáveis. Mulheres apresentam um risco elevado em desenvolver EM (PARADELA et al; 2014; ISOBE et al; 2016), principalmente em idades mais avançadas. Esta tendência pode ser parcialmente explicada pela interação deste genótipo *HLA-DRB1\*15*, uma vez presente e polimorfismos nos receptores de estrogênio e da vitamina D (PARADELA et al., 2014). Estudos futuros se fazem necessários para confirmar ou refutar se esta hipótese se aplica também ao sexo masculino.

A influência dos fatores genéticos parece ser determinante das características clínico-epidemiológicas da EM (LISAK et al., 1975; CHEMALY, LEFRANÇOIS, PÉRUSSE, 2000; CRITCHLEY, 2004; ISOBE et al; 2016). As moléculas do MHC classe II, em especial os grupos alélicos *HLA-DRB1\** tem sido exaustivamente associadas não apenas ao estabelecimento da EM, mas também na determinação de suas características clínicas e imunológicas (OKSENBERG e BARANZINI, 2010). Altas prevalências do alelo *HLA-DRB1\*15* têm sido correlacionadas a idade precoce de início da doença, bem como a graus elevados de incapacidade física (DYMENT, EBERS, SADOVINICK, 2004; BALNYTE et al., 2015; ISOBE et al; 2016). Os dados encontrados na amostra considerada revelaram maior prevalência do grupo alélico *HLA-DRB1\*15* naqueles indivíduos cuja doença se manifestou de maneira menos agressiva, caracterizada pela ausência de sequela clínica. Em contrapartida, não houve diferença na prevalência do alelo *HLA-DRB1\*15* quando se classificou a amostra de acordo com a idade de diagnóstico da doença. Estudos futuros, com amostras maiores, podem esclarecer este dado.

A mensuração dos níveis de proteínas totais no líquido céfalo-raquidiano de portadores de esclerose múltipla é de fundamental importância, pois diz muito a

respeito da disfunção da barreira hematoencefálica, sinal mais evidente na forma primária progressiva da doença. Sendo assim, os níveis séricos de IgG podem ser um preditor da atividade da doença. (DA GAMA, 2012 ; BAKShI, et al; 2015; BRANDLE et al; 2016; HALBGEBAUER et al; 2016).

Os níveis sérios das imunoglobulinas dependem de uma variedade de fatores envolvidos no desenvolvimento do sistema imune, fatores genéticos, sociodemográficos (idade, sexo), fatores geográficos ou ambientais como história de alergia ou infecções recorrentes e especialmente no caso da família tipo G, podem aparecer aumentados nos casos de infecções bacterianas, virais e parasitárias (KALLAUR et al., 2007), o que pode explicar os níveis de IgG nos indivíduos do grupo controle do estudo em questão.

Dados de estudos epidemiológicos sobre a detecção de bandas oligoclonias do tipo G em indivíduos com esclerose múltipla variam muito, mas em geral, maiores percentuais de doentes com registros positivos destas bandas de imunoglobulina tipo G são relatados em países cuja influência caucasiana é grande, como é o caso do norte europeu, que alcança taxas de até 95% (LUNDING, MIDGARD, VEDELER, 2000; IMRELL et al, 2009; LOURENÇO et al; 2012; BRANDLE et al; 2016). No caso de populações onde a herança européia não é tão marcante, como o Brasil, frequências relativamente baixas, em torno de 54,0%, de indivíduos portadores de EM expressam pelo menos duas bandas oligoclonais de IgG no líquido céfalo-raquidiano (BRANDLE et al; 2016), quando comparado a outras populações caucasianas. A associação de variáveis como a localização geográfica, características clínicas da doença bem como dos fatores imunogenéticos da população em questão, justificam essa variação na síntese de IgG nas diferentes populações. Por outro lado, o padrão de resposta Th1, característico da doença, pode justificar o aumento no soro de IgG (IMRAN, et al; 2016).

Indivíduos de origem não caucasiana portadores de EM tendem a exibir o aumento dos índices séricos de IgG como também do percentual de bandas oligoclonais no LCR (PUCCIONE-SOHLER et al, 2001). Esta assertiva sugere a necessidade da investigação da integridade da BHE nesta raça, com vistas a conhecer o padrão dos mecanismos de expressão molecular em sua superfície a fim de elucidar esta tendência.

Altos índices de IgG sérico em portadores de esclerose múltipla tem sido associados a indivíduos do sexo feminino que também apresentaram persistência de

mais de uma sequela clínica, contudo, nestas pacientes, o início da doença foi mais tardio (LECHNER-SCHOTT et al., 2011; MERO et al., 2013; GORIS et al., 2015; DECKER et al; 2016). A precocidade na manifestação da doença na população estudada pode ser uma característica clínico-demográfica da população estudada que pode ter relação com fatores sócio-ambientais.

Dentre os indivíduos que manifestaram elevação IgG no soro, a maior parte desenvolveu a forma surto-remissiva (28,9%). A forma clínica em questão, é caracterizada por frequentes, embora mais sutis episódios de destruição da bainha de mielina, o que caracteriza o surto. Essa atividade transitória dos linfócitos que caracteriza a patogênese desta forma clínica de EM pode justificar o aumento de IgG sérico nos doentes surto-remissivos, podendo indicar, para esta forma clínica, um marcador de atividade inflamatória da doença, mesmo durante sua fase de remissão ou ainda de ineficácia do tratamento, nesta população. Diante do exposto, justifica-se mais uma vez o conhecimento das características clínicas e epidemiológicas, mas acima de tudo das influências genéticas que esta doença recebe, para o estabelecimento da conduta terapêutica individualizada.

A maior parte dos negros ou pardos da amostra faz uso de terapia com algum tipo de Interferon (IFN- $\beta$ 1-b ou IFN- $\beta$ 1-a). Afro-descendentes portadores de EM apresentam um curso clínico mais agressivo da doença, quando comparados as indivíduos da raça branca, quando tratados com IFN- $\beta$ 1a (CREE et al., 2005; PEREIRA et al; 2012). A eficácia limitada no tratamento de afro-descendentes portadores de EM com IFN- $\beta$ 1a pode estar relacionada ao desenvolvimento, por parte destes indivíduos, de anticorpos neutralizantes de IFN- $\beta$ 1a (TRABOULSEE et al., 2008; PINA, 2012). Esta indução pode ser causada a partir da interação do IFN- $\beta$ 1a com os alelos associados a etiopatogenia da EM.

O imunomodulador do tipo acetato de glatirama foi mais eficaz em controlar a alteração do IgG no soro. A relação direta que existe entre o uso de imunomoduladores do tipo corticosteróides e a redução da síntese intratecal de IgG, bem como a eficácia superior que a terapia com anticorpos monoclonais humanizados tem em reduzir os níveis séricos de IgG quando comparada àquelas à base de esteróides já foi descrita na literatura e IFN  $\beta$  (LAMES, FREQUEN, HOMMES, 1996; PUCCIONI-SOHLER et al., 2001; SELTER et al., 2013). A redução dos níveis de IgG

no soro associada ao copolímero pode estar relacionada a ligação do copolímero às moléculas do MHC classe II, nas fases iniciais da doença (FUSCO et al., 2001), ocorrendo desta forma o bloqueio de toda cascata inflamatória que culmina com a síntese intratecal de IgG já nos estágios iniciais da alteração.

Existe forte associação entre a maior frequência do alelo *HLA-DRB1\*15* e aumento dos níveis séricos de IgG. (BALNYTE et al., 2015; GORIS et al., 2015). Apesar da real influência deste alelo ainda não ter sido esclarecida, indentificar a sua presença nos estágios iniciais da EM pode ajudar a prever o prognóstico uma vez que fatores genéticos são determinantes nos níveis destes anticorpos cuja elevação dos níveis séricos remetem à progressividade.

A detecção dos alelos *HLA-DRB1\** nos estágios iniciais da EM ajuda a preve seu curso clínico e a escolher o tratamento mais apropriado para controlar sua progressão. Contudo, esta evidência precisa ser investigada, especialmente em estudos que considerem uma amostra maior de pacientes, para que se possa compreender de que forma a presença de um determinado alelo direciona o prognóstico da EM.

Estudos que avaliam o papel dos alelos *HLA-DRB1\** na etiologia da esclerose múltipla conseguem apenas determinar a prevalência desses alelos, diferente nas diversas populações, o que pode ser explicado principalmente pela sua composição racial. Entretanto, estes trabalhos não conseguem identificar qual o real papel desta influência genética na etiologia da doença. Pesquisas futuras, de associação genômica podem ajudar a elucidar esta associação. Por hora, a determinação dos alelos *HLA-DRB1\** nos estágios iniciais da EM é de grande valia na previsão do curso clínico da doença bem como na escolha da melhor forma de tratamento, com vistas a retardar sua progressividade. Por outro lado, a identificação dos níveis de IgG, seja no soro ou ainda no LCR de portadores desta condição traz grande contribuição para o monitoramento da atividade da EM e prognóstico de seu curso clínico.

## **8 CONCLUSÕES**

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode concluir-se que:

- A distribuição dos alelos *HLA-DRB1\*15* encontrada na população estudada segue um padrão bastante semelhante aquele referido em estudos de diferentes regiões do planeta.
- A prevalência destes alelos, demonstrou forte associação com as variáveis sexo e raça/etnia, uma particularidade desta população quando comparada aos casos de EM relatados por outros estudiosos.
- A determinação dos alelos *HLA-DRB1\** nos estágios iniciais da EM é de grande valia na previsão do curso clínico da doença bem como na escolha da melhor forma de tratamento, com vistas a retardar sua progressividade além de permitir a identificação de possíveis fatores de proteção contra doença.
- A natureza étnica miscigenada da população estudada favoreceu a baixa prevalência de indivíduos com anormalidade nos níveis séricos de IgG
- A identificação dos níveis de IgG, seja no soro ou ainda no LCR de portadores desta condição traz grande contribuição para o monitoramento da atividade da EM e prognóstico de seu curso clínico, mas na população em questão, não é indicador de progressividade.
- O real papel desta influência genética na etiopatogenia da doença ainda precisa ser esclarecido em pesquisas futuras, de associação genômica.

**REFERÊNCIAS**



1. ABREU, P. et al. Esclerose Múltipla: Epidemiologia, etiopatogenia fisiopatologia e diagnóstico diferencial. *Sinapse*, Lisboa, v. 12, n. 2, p.5-14, nov.2012.
2. ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA. Departamento Científico de Neuroimunologia. Diretrizes para o tratamento da esclerose múltipla com drogas imunomoduladoras. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v.63, n.3-B, p.892-895, jun. 2005.
3. AHARONI, R. et al. Demyelination arrest and remyelination induced by glatamier acetate treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PNAS*, Washington, v.105, n.32, p. 11358-11363, ago. 2008.
4. ALCINA, A. et al. Multiple sclerosis risk variant HLA DRB1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PLOS*, Valencia, v.7, n.1, p.1-9, jan, 2012.
5. ALVES-LEON, S.V. et al. Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a brazilian cohort patients. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 66, n. 3-B; p.671-677, jun. 2008.
6. ALVES-LEON, S.V. et al. Ethnicity-dependent association of HLA DRB1-DQA1-DQB1 alleles in Brazilian multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Scand*, Singapura, v.115, n.36, p.306-311, ago. 2007.
7. ANDERSON, P.B.; GOODKIN, D. Topics in Primary Care Medicine- Current Pharmacology Treatment of Multiple Sclerosis Symptoms. *West J Med*, San Francisco, v. 165, n.1, p. 313-317, nov. 1996.
8. ANDERSON, M. et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, Sidney, v.57, n.4, p. 897-902, out, 1994.
9. ARAUJO, C.R.; MOREIRA, M.A.; LANA-PEIXOTO, M.A. Profile of the Brazilian scientific production in multiple sclerosis. *Braz J Med Biol Res*, São Paulo, v. 39, n. 9, p. 1143-1148, maio. 2006.

10. ARAÚJO, E.A.S.; FREITAS, M.R.G. Benefit with methylprednisone in continuous pulsetherapy in progressive primary form of multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 66, n. 2-B, p. 350-353, abr. 2008.
11. ARRUDA, W.O. et al. Acute myeloid leukaemia induced by mitoxantrone. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 63, n. 2-A, p. 327-329, abr. 2005.
12. ASCHERIO, A.; MUNGER, K.L. SIMON, K.C. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, Philadelphia, v. 9, n.1, p.599-612, nov. 2010.
13. ASTIER, A.L. T-cell regulation by CD46 and its relevance in multiple sclerosis. *Immunol*, London, v. 124, n. 1, p. 149-154, jan. 2008.
14. ATKINS, G. et al. MS and micromolecular mimicry. *JCI*, Cambridge, v.108, n.02, p. 311-318, jul.2001.
15. BAECHER-ALLAN, C.; HAFLER, D.A. Supressor T cells in human desases. *J Exp Med*, Boston, v. 200, n. 3, p. 273-276, ago. 2004.
16. BAKSHI, R. et al. Serum lipid antibodies are associated with cerebral tissue damage in multiple sclerosis. *Neurology*, Boston, v. 3, n.1, p.1-11, jun. 2016.
17. BALNYTE, R. et al. Associations of HLA DRB1 Alleles with Igg Oligoclonal Bands and Their Influence on Multiple Sclerosis Course and Disability Status. *JNN*, Los Angeles, v. 6, n.1, p. 1-5, fev.2015.
18. BAKSHI, R. Serum lipid antibodies are associated with cerebral tissue damage in multiple sclerosis . *Neurology*. Boston, v.3,n.1,p.1-11, dez. 2015.
19. BECKMAN COULTER. Immage Immunochemistry Systems Chemistry Information Sheet for Immunoglobulin G for in vitro diagnostic use. Reference 446400. p.1-11.ago.2010.
20. BERTRAMS, J.; KUWERT, E. HLA antigen frequencies in multiple sclerosis: significant increase of HLA-3, HLA-10 and W5 and decrease of HLA-12. *Eur Neurol, Berlim*, v.7, n.74, p. 87-94, fev, 1972.

21. BETTENCOURT, A. et al. Moleçular Genetic Studies of Multiple Sclerosis in the Portuguese Population. *Acta Med Port*, Cidade do Porto, v. 25, n.4, p.224-230, jul-ago, 2012.
22. BIELENKOVA, B.; MARTIN, R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*, Bethesda, v.1, n.127, p. 1463-1468, jun. 2004.
23. BINDER, M.D. et al. Common and low frequency variants in MERTK are independently associated with multiple sclerosis susceptibility with discordant association dependent upon *HLA-DRB1\*1501* status. *PLOS*. São Francisco, v.12,n.3, p. 1-25, mar, 2016.
24. BRANDÃO, C.O. et al. Cytokines and intratecal IgG synthesis in multiple sclerosis patients during clinical remission. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 63, n. 4, p. 914-919, ago. 2005.
25. BRANDLE, A.M. et al. Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *PNAS*. Washington, v. 113, n.28, p. 7864-7869, jul. 2016.
26. BRUM, D.G. et al. Association of the HLA DRB1\*15 allele group and the HLA DRB1\*1501 and the HLA DRB1\*1503 alleles with multiple sclerosis in white and mulatto samples from Brazil. *J Neuroim*, Ohio, v.189, n.1, p. 118-124, jun. 2007.
27. CALLEGARO, D. et al. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 60, n.3-B, p. 869-874, ago, 2002.
28. CALLEGARO, D.; GOLDBAUM, M.; MORAIS, L. et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand*, Spain, v. 104, n.1, p. 208-213, jul, 2001.
29. CARDOSO, E. et al. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the state of Bahia, Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 64, n. 3-B, p. 727-730, jun. 2006.

30. CARVALHO, A. et al. Determinação de autoanticorpos para antígenos da mielina no soro de pacientes HLA - DQB1\*0602 com esclerose múltipla. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 61, n.4, p. 968-973, fev. 2003.
31. CEPOK, S. et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *JCI*, Michigan, v. 115, n. 5, p. 1352-1360, mai. 2005.
32. CHEMALY, D.; LEFRANÇOIS, A.; PÉRUSSE, R. Oral and Maxillofacial manifestations of multiple sclerosis. *J. Can. Dent. Assoc*, Canadá, v. 66, n. 11, p. 600-605, mai. 2000.
33. CORONA, T.; ROMAN, G.C. Multiple sclerosis in Latin America. *Neuroepidemiology*, Freiburg, v. 26, n.1, p. 1-3, jan, 2006.
34. CORREALE, J. Epidemiology of MS in Latin America. *Mult Scler*, Canadá, v.1, n.1, S15, abr, 2009.
35. CRAELIUS, W. Comparative epidemiology of multiple sclerosis and dental caries. *J Epidemiol Community Health*. London, v.32,n.1, p.155-165, out. 1978.
36. CREE, A.B. et al. Response to interferon beta 1-a treatment in African American multiple sclerosis patients. *Arch Neurol*, Chicago, v.62, n,11, p. 1681-1869, nov.2005.
37. CRITCHLEY, E. P. Multiple sclerosis initially presenting as facial palsy. *Aviat Space Environ Med*, Kirtland, v.75, n.2, p.1001-1004, nov. 2004.
38. CRISTIANO, E. et al. The epidemiology of multiple sclerosis in Latin America and Caribbean: a systematic review. *Mult Scler*, Canadá, v. 19,n.7,p.844-854, out. 2012.
39. CRISTIANO, E. PATRUCCO, L. GIUNTA, D. et al. The prevalence of multiple sclerosis in Buenos Aires: A 16-year health maintenance organization-based study. *Eur J Neurol*, Spain, v.17, n.1,p.479-482, jul. 2010.
40. CRISTIANO, L. et al. Evaluation of Pregnancy Outcomes from the TYSABRI® (Natalizumab) Pregnancy Exposure Registry (P02.127). *Neurology*, New York, v. 80, n.7, p. 122-127, fev. 2013.

41. DA GAMA, P.D. O papel do líquido céfalo raquidiano no diagnóstico da esclerose múltipla. *LAMSJ*. Sorocaba, v.1, n.2, p.70-77, mai. 2012.
42. DA GAMA, P.D. et al. Study of oligoclonal Bands restricted to the cerebrospinal fluid .in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. *Arq Neuropsiquiatr*. São Paulo, v. 67, n. 04, p.1017-1022, ago. 2009.
43. DECKER, y. et al. Abnormal galactosylation of immunoglobulin G in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *MSJ*. Amburgo, v.1, n.1, p,1-10, jan. 2016.
44. DENIS, N.L.; GÁLVEZ. M.E.O.; SÁNCHEZ, G.M. Esclerosis múltiple: aspectos generales y abordaje farmacológico. *Rev Cub Farmac*, Havana, v. 43, n.2, p.1-14, fev. 2009.
45. DYMENT, D.A.; EBERS, G.C.; SADOVINICK, A.D. Genetics of Multiple Sclerosis. *The Lancet*, Vancouver, v.3, n.1, p.104-110, fev. 2004.
46. DYMENT, D.A. et al. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *HMG*, Oxford, v.14, n.14, p.2019-2026, mai. 2005.
47. EBERS, G.C. Genetics and multiple sclerosis: na overview. *Ann Neurol*, São Francisco, v.1, n.36, p. 12-14, out. 1994.
48. FERNANDES, C. C. P. *Surto-remissão*: caracterização deste tipo específico de esclerose múltipla. 2009. 43f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, p. 12-16, 2009.
49. FERROLI, P. Linear pontine and trigeminal root lesions and trigeminal neuralgia. *Arch Neurol*, Milan, v.58,n.8,p.1311-1312, ago.2009.
50. FRAGOSO, Y.D.; FIORE, A.P.P. Description and characteristics of 81 pacientes attending the reference center for multiple sclerosis of the coastal region of the state of São Paulo-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v.63, n. 3-B, p. 741-744, jun. 2005.
51. FRIEDMAN, R. M. Clinical use of interferons. *Br J Clin Pharmacol*, Bethesda, v. 65, n.2, p. 158-162, dez. 2007.

52. FOSSEY, S. et al. Identification of molecular biomarkers for multiple sclerosis. *JMD*, Nashville, v. 9, n.2, p. 197-204, abr. 2007.
53. FUSCO, C. et al. HLA-DRB1\*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*, New York, v.57, n.11, p. 1976-1979, dez. 2001.
54. GALLUD, L. et al. Multiple sclerosis as first manifestation in oral and facial area: presentation of four cases. *Med Oral Cir Bucal*, Valencia, v.11, n.1, p.141-5, dez. 2006.
55. GARCÍA, D.R.; SALAVIERRI, L.A.S. Esclerosis múltiple. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Med Integr*, Havana, v. 22, n.2, p. 27-37, ago. 2006.
56. GRZESIUK, A.K. Epidemiological profile in Multiple Sclerosis patients , Uberaba, MG, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 69, n.5, p. 852, nov. 2011.
57. GRZESIUK, A.K. Características clínicas e epidemiológicas de 20 pacientes portadores de esclerose múltipla acompanhados em Cuiabá- Mato Grosso. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 64, n. 3-A, p. 635-638, jun. 2006.
58. GORODEZKY, C.; CASTRO-ESCOBAR, L.E.; ESCOBAR-GUTIÉRREZ, A. The HLA system in the prevalent Mexican indian group: The Nahuas. *Tissue Antigens*, Spain, v. 25, n.1, p. 38-46, dez. 1985.
59. GORIS, A. et al. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain*, Cambridge, v. 138, n.1, p. 632-643, jan. 2015.
60. HALBGEBAUER, S. et al. detection of intrathecal immunoglobulin G synthesis by capillary isoelectric focusing immunoassay oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J. Neurol*, Cambridge, v.263, n.1, p. 954-960, mar. 2016.
61. HONAN, W.P. et al. Paradoxical effects of temperature in multiple sclerosis. *J Neurol, Neurosur and Psych*, London, v.5, n.1, p.1160-1164, jan.1978.
62. HOLLEMBACH, J.A.; OKSEMBERG, J.R. The immunogenetics of multiple sclerosis , a comprehensive review. *Jornal of Autoimmunity*, São Francisco, v. 64, n.01, p. 13-25, jul. 2015.

63. HUGHES, R. Immunotherapy for multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. London, v. 57, n.1, p. 3-6, mar. 1994.
64. IMRELL, K. et al. HLA DRB1\*15 and cerebrospinal-fluid-specific oligoclonal immunoglobulin G bands lower age at attainment of important disease milestones in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, Philadélfia, v. 210, n.1, p. 128-130, mar. 2009.
65. IMRAN, H.M. et al. Induction of regulatory T-cells from memory T-cells is perturbed during acute exacerbation of multiple sclerosis. *Clinical Immunology Amsterdam*. v.166, n.167, p.12-18, mai. 2016.
66. INTERNAMENTOS por esclerose múltipla: 2008-2015: banco de dados. Disponível em: <[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)>. Acesso em 26 de maio de 2015.
67. ISOBE, N. et al. Association of HLA Genetic Risk Burden with disease phenotypes in multiple sclerosis. *Jama Neurology*. São Francisco. v. 73,n.7, p. 795-802, mai. 2016.
68. JORDY, S.S; TILBERY, C.P.; FAZZITO, M.M. Immunomodulatory therapy migration in relapsing remitting multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 66, n.1, p. 11-14, dez. 2008.
69. KALLAUR, A.P. et al. Frequência das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas dos pacientes atendidos no Hospital Universitário, Londrina, Paraná. *Semina*, Londrina, v.28, n.1, p.23-32, jan/jun. 2007.
70. KAUFMAN, M. et al. Natalizumab treatment shows no clinically meaningful effects on immunization responses in patients with relapsing-remiting multiple sclerosis. *Journal o Neurological Sciences*, Amsterdã, v. 34, n.1, p. 22-27, mar. 2014.
71. KARANDIKAR, N.J. et al. Glamatier acetate (copaxone) therapy induces CD8<sup>+</sup> T cell responses in patients with multiple sclerosis. *JCI*, Ann Arbor, Michigan, v. 109, n. 5, p. 641-649, mar. 2002.
72. KILLESTEIN, J.; HARTUNG, H.P. Interferon in multiple sclerosis: predicting response at an early stage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, London, v. 79, n.6, p.616-617, jun. 2008.

73. LAMES, K.J.B; FREQUEN, S.T.M.F.; HOMMES, O.R. Effects of immunotherapeutic strategies on cerebrospinal fluid parameters in multiple sclerosis. *Brain*. Cambridge, v.1, n.1, p. 113-122, out. 1996.
74. LARONI, A. et al. Dysregulation os regulatory CD56 bright NK cells/ T cells interactions in multiple sclerosis. *Journal of Autoimmunity*. Amsterdan. v. 72, n.1, p. 8-18, mai. 2016.
75. LASSMANN, H. Multiple Sclerosis: Lessons from molecular neuropathology. *Exp.Neurol*, Amsterdã, v.262-A, p. 2-7, dez.2014.
76. LANA-PEIXOTO, M.A. et al. Consenso expandido do BCTRIMS para o tratamento da esclerose múltipla: III diretrizes baseadas em evidências e recomendações. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v.60, n.3, p. 881-886, ago.2002.
77. LECHNER-SCOTT, J. et al. The frequence of CSF oligoclonal banding in multiple sclerosis increases with latitude. *MSJ*, New Castle, v.18, n.3, p.974-982, nov. 2011.
78. LINK, H.; HUANG, Y.M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol*,Philadélfia, v.180, n.01, p. 17-28, nov.2006.
79. LISAK, R.P.; LEVINSON, A.I.; ZWEIMAN, B.; ABDU, N.I. T and  $\beta$  lymphocytes in multiple sclerosis. *Clin. Exp Immunol*,Pennsylvania, v. 22, n.2, p.30-34, jan. 1975.
80. LOURENÇO, P. et al. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis associated with disease course and progression. *MSJ*. Montreal, v. 19, n.5, p.577-584, ago. 2012.
81. LUNDING, J.; MIDGARD, R.; VEDELER, C.A. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand*, Singapura,v.102,n.5,p. 322-325, jun.2000.
82. MARQUES, C.D.L. et al. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Rev Bras Reumatol*,Recife, v. 50 n.1, p.67-80, nov. 2010.



83. MARROSU, M.G. et al. Sardinian multiple sclerosis associated with HLA-DR4: a serologic and molecular analysis. *Neurology*, Minneapolis, v.1, n.38, p. 1749-1753, dez. 1988.
84. MEANEY, J.F.M. et al. Association between trigeminal neuralgia and multiple sclerosis: role of magnetic resonance imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, London, v. 59, n.3, p.253-259, abr. 1995.
85. MENDES, M.F. et al. Depressão na esclerose múltipla forma remittente-recorrente. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 61, n. 3-A, p. 591-595, abr. 2003.
86. MERO, I.L.; et al. Oligoclonal band status in Scadinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PLOS*, UK, v.8, n.3, p.1-10, mar.2013.
87. MINGUETTI, G. Ressonância magnética na Esclerose Múltipla. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 59, n.3-A, p.563-569, abr. 2001.
88. MOUTSIANAS, L. et al. International IBD Genetics Consortium (IIBDGC); International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. Nova York, v. 47, n.10, p. 1107-1116, nov. 2015.
89. MITCHELL, J.P. et al. Lateral rectus muscle palsy, facial numbness and ataxia as the initial manifestation of multiple sclerosis. *J Nati Med Assoc*, New York, v.100, n.5, p.572-574, maio. 2008.
90. MOREIRA, M.A. et al., Chemokines in the cerebrospinal fluid of patients with active and stable relapsing-remitting multiple sclerosis. *Braz J Med Biol Res*, Ribeirão Preto, v.39, n.4, p.441-445, dez. 2008.
91. NAITO, S. et al. Multiple sclerosis: association with HLA-A3. *Tissue Antig*, UK, v.2, n.1, p.1-4, jan, 1972.
92. OKSENBERG, J.R.; BARANZINI, S.E. Multiple Sclerosis genetics-- is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol*, Londres, v.6, n.1, p. 429-437, ago.2010.
93. PADILLA-DOCAL, B. et al. C3c intratecal synthesis evaluation in patients with multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 65, n.3-B, p. 800-802, jun. 2007.

94. PARADELA, E. R. Multiple sclerosis susceptibility in a Brazilian sample, HLA and CIITA genes. *Arq. Neuro-Psiquiatri.*, São Paulo, v. 72, n. 6, p. 482, Jun. 2014.
95. PARADELA, E. R. et.al. The CIITA genetic polymorphism rs4774\*C in combination with the HLA-DRB1\*15:01 allele as a putative susceptibility factor to multiple sclerosis in Brazilian females. *Arq. Neuro-Psiquiatri.*, São Paulo, v.73, n.4, p. 283-288, dez. 2014.
96. PEREIRA, V.C.S.R. et al. Clinical response to interferon beta and glatiramer acetate in multiple sclerosis patients: a Brazilian cohort. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 70, n.10, p. 774-779, jun.2012.
97. PINA, L.I.G. Esclerose Múltipla: terapêutica com IFN- $\beta$ . 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, p. 29, 2012.
98. POLMAN, C.H.; UITDEHAAG, B. M. Drug treatment of multiple sclerosis. *JBM*, Amsterdam, v. 321, n.1, p.19-26, ago. 2000.
99. PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Esclerose múltipla: correlação clínico-laboratorial. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v.59; n.1; p. 89-91, out. 2001.
100. PUGLIATTI, M.; RIISE, T.; SOTGIU, M.A. et al. Increasing incidence of multiple sclerosis in the province of Sassari, northern Sardinia. *Neuroepidemiology*, Freiburg, v. 25, n.1, p. 129-134, jul. 2005.
101. PUGLIATTI, M; SOTGIU, S.; ROSATI, G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg*, Ireland, v.104, n.1, p.182-191, mar.2002.
102. RAMAGOPALAN, S.V. et al. Expression of the Multiple Sclerosis- Associated MHC Class II Allele HLA-DRB\* 1501 is Regulated by Vitamin D. *PlosGenetics*, UK, v.5, n. 2, p. 1-6, fev. 2009.
103. RAMAGOPALAN, S.V. et al. The Inheritance of Resistance Alleles in Multiple Sclerosis. *Plos Genetics*, UK, v. 3, n.9, p.1607-1613, set. 2007.
104. REDOME. *Resultados do perfil genômico da população brasileira. Estado da Bahia*. Disponível em: <https://munogenetica.org/resultados/perfil-genomico-do-redome-rereme/redome-hla-drb1>. Acesso em 13 jul.2016.

105. REZENDE, P.A.; ARRUDA, W.O. Aspectos genéticos da Esclerose Múltipla. II. Sistema HLA. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 54, n.3, p. 439-450, mar.1996.
106. ROSATI, G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: An update. *Neurol Sci*, Ireland,v.22, n.1, p. 117-139, mai. 2001.
107. SACHDEV, A. et al. PTPN22 1858T is not a risk factor for North American pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* ,UK, v. 6, n.20, p. 514-519, jun. 2011.
108. SACRAMENTO, T.O. et al. Orofacial changes in pacientes with multiple sclerosis treated in Brazil. *IJMMS*, Maryland, v.35, n.5, p. 139-143, mai. 2011.
109. SANTOS, E.C.; YOKOTA, M. DIAS, N.F.R. Esclerose múltipla: estudo de pacientes com a forma surto-remissão cadastrados na Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 65, n. 3-B, p. 885-888, jun. 2007.
110. SANTOS, C.C.C. Analysis of HLA DP, DQ, DR alleles associated with multiple sclerosis susceptibility in a population of pacientes from the Rio de Janeiro city. 2002. 78f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, p. 45-64, 2002.
111. SAWCER, S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain Advance*,Cambridge,v. 1, n.1, p. 1-28, maio. 2008.
112. SCHIFFMAN, S.S. Editorials. *BMJ*, London, v.17, n.2, p. 35- 43, abr. 1976.
113. SELTER, R.C. et al. Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients. *MSJ*, Califórnia, v.19, n.11, p.1454-1461. jan. 2013.
114. SHEREMATA, W.A. et al. Evidence of platelet activation in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, London, v. 5, n.27, p.1-6, jun. 2008.
115. SILVA, K.G.P. et al. Potential risk factors for multiple sclerosis in Rio de Janeiro. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 67, n. 2-A, p. 229-234, fev. 2009.
116. SILVA, A.M. et al. The role of HLA-DRB1 alleles on susceptibility and outcome of a Portuguese Multiple Sclerosis population. *J Neurol Sci*, Louisiana, v.258,p.258-269, mar. 2007.

117. TIENARI, P.J. et al. Reappraisal of HLA in multiple sclerosis: close linkage in multiplex families. *Eur J Hum Genet*, Netherlands, v.1, n.1, p.257-268, mar. 1993.
118. TRABOULSEE, A. et al. Reduction in magnetic resonance imaging T2 burden of disease in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: analysis of 48-week data from the EVIDENCE (Evidence of Interferon Dose-response: European North American Comparative Efficacy) study. *BMC Neurology*, London, v.8, n.11, p.1-7, abr. 2008.
119. TEIXEIRA, T.M.; COSTA, C.L. O papel da vitamina D no Lupus Eritematoso Sistêmico. *Rev Nutr*, Campinas, v. 25, n.4,p. 531-538, jul/ago. 2012.
120. VAZQUEZ-MARRUFO, M. et al. Quantitative elettroencefalografy reveals different physiological profiles between binig and remitting-relapsing multiple sclerosis patient. *BMC Neurology*, London, v.8, n.44, p.1-7, nov.
121. VENKEN, K. et al. Compromised CD4+CD25 high regulatory T-cell function in patients with relapsing –remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunol*, Oxford, UK v. 123, n. 1, p. 79-89, jul. 2007.
122. VIGLIETTA, V. et al. Loss of functional supression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med*, Boston, v. 199, n. 7, p. 971-979, abr. 2004.
123. VIRLEY, D.J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. *Neuro Rx*, London,v. 2, n.4, p. 638-649, out. 2005.
124. VOLTARELLI, J.C. Hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases in Brazil: current status and future prospective. *Rev Bras Hematol Hemoter*, Ribeirão Preto v.24, n.3, p. 1-13, mar. 2010.
125. YBARRA, M.I. et al. Bipolar disorder and multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo,v. 65, n. 4-B, p.1177-1180, set. 2007.



## APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO(A) COMO VOLUNTÁRIO(A) A PARTICIPAR DA PESQUISA: “ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE ESCLEROSE MÚLTIPLA, *HLA-DRB1*\* E NÍVEIS SÉRICOS DE IgG EM UMA POPULAÇÃO MISCIGENADA DE SALVADOR, BA”.

O motivo que nos leva a estudar o problema se deve a natureza comprometedora da esclerose múltipla, uma doença que provoca no doente uma série de limitações, podendo dificultar seu convívio social e familiar. Existem estudos sugerindo que a saliva de pessoas com esclerose múltipla pode apresentar algumas substâncias em quantidades elevadas, quando comparadas com a da saliva de indivíduo saudáveis, que podem auxiliar bastante no diagnóstico e acompanhamento da doença. Além disso, o estudo também busca a possível descoberta e o aprimoramento de um novo exame para identificar a doença, diminuindo os riscos e o incômodo dos exames atualmente realizados.

O objetivo desse projeto é realizar o exame no sangue de pessoas com Esclerose Múltipla atendidos no Hospital das Clínicas da UFBA, e comparar com o exame de sangue de indivíduos saudáveis. O procedimento de coleta do sangue será realizado da seguinte forma: Preenchimento de um pequeno questionário com informações sobre a doença, identificação do doente; por fim, será recolhida uma pequena quantidade de sangue, por uma profissional qualificada, com curso técnico e bastante experiência na área. O procedimento para a colheita do sangue é semelhante ao utilizado nos exames de laboratório convencionais; onde se extrai uma pequena quantidade de sangue de uma pequena veia localizada no braço. Todos estes procedimentos serão realizados uma única vez por cada pessoa, no mesmo dia da consulta de acompanhamento com o neurologista, no hospital.

Durante e após a colheita desta amostra de sangue, alguns desconfortos podem surgir, tais como vermelhidão e rouidão no local que a agulha foi introduzida e ainda um leve incômodo no momento da introdução da mesma. Nossa equipe de laboratório está pronta para lhe atender caso haja os incômodos relatados.

Como benefício desse estudo tem-se a possibilidade de compreendermos melhor a esclerose múltipla e, caso seja confirmada a interação destas substâncias presentes no sangue\saliva com a doença, poderá ser desenvolvido um novo tipo de exame para identificar a doença que seja mais cômodo e com menor risco do que os atualmente utilizados, e tão eficaz quanto eles.

Você poderá esclarecer alguma dúvida sobre a pesquisa em qualquer momento que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer perda de benefícios ou acompanhamento do serviço.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Sua identidade será preservada em segredo. Os resultados dos exames serão comunicados a você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material

que indique a sua participação não será revelado a outras pessoas, sendo apenas do conhecimento dos pesquisadores. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Programa de Pós- Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e sistemas do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal Da Bahia, e outra será fornecida a você.

Caso você concorde em participar do estudo, assine esse termo de consentimento.

Em caso de dúvida você pode contatar os pesquisadores Dr<sup>a</sup>. Thaiana de Oliveira Sacramento, tendo como orientador Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roberto Meyer no endereço abaixo. Em caso de denúncia, pode contatar o CEP FMB UFBA (endereço abaixo).

Salvador, ....., de ..... de .....

.....

Assinatura do voluntário/Responsável

.....

Assinatura do Pesquisador Responsável

Polegar

Dúvidas e Esclarecimentos, entrar em contato pelos telefones:

**LABIMUNO ICS-UFBA (Professor Roberto Meyer \Dra. Thaiana Sacramento)**

Av. Reitor Miguel Calmon, s/n-Vale do Canela, CEP 40.110-100. TEL: 32359682\ 32455971

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico, CEP 40.026-010. TEL: (071) 32835564.

**APÊNDICE B – FICHA DE COLETA**Paciente n<sup>o</sup> \_\_\_\_\_

Idade: ( ) ≤19 ( ) 20-29 ( ) 30-39 ( ) 40-49 ( ) ≥50

Sexo: ( )F ( )M Raça/ etnia: ( ) BRANCA ( ) NEGRA/PARDA

Forma Clínica da EM: ( ) SR ( ) PP ( ) SP

Presença de sequela: ( ) sem sequela ( ) 1 sequela ( ) associação de sequela

Idade de diagnóstico: ( ) ≤19 ( ) 20-29 ( ) 30-39 ( ) 40-49 ( ) ≥50

Imunomodulador: ( ) não usa ( ) Acetato de Glamatiarama

( ) Interferon 1-a ( ) Interferon 1-b ( ) natalizaumab

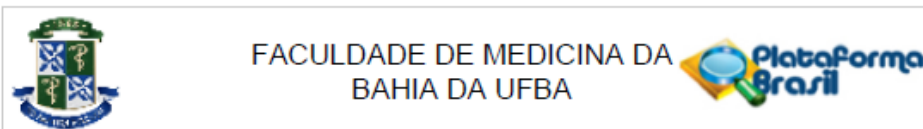
Alelo1 HLA DRB1\* encontrado \_\_\_\_\_

Alelo 2 HLA DRB1\* encontrado \_\_\_\_\_

Nível sérico de IgG: \_\_\_\_\_





**ANEXO A – COMPROVANTE DE ENVIO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

FACULDADE DE MEDICINA DA  
BAHIA DA UFBA

Plataforma  
Brasil

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL UTILIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE HLA e IgG SOLÚVEIS NA SALIVA COMO BIOMÁRCADORES DA ESCLEROSE  
**Pesquisador:** THAIANA DE OLIVEIRA SACRAMENTO  
**Versão:** 1  
**CAAE:** 35171314.0.0000.5577  
**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:** 073090/2014  
**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

**ANEXO B – FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****Dados do Projeto de Pesquisa**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL UTILIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE HLA e IgG SOLÚVEIS NA SALIVA COMO BIOMARCADORES DA ESCLEROSE MÚLTIPLA.

Pesquisador: THAIANA DE OLIVEIRA SACRAMENTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35171314.0.0000.5577

Submetido em: 21/09/2014

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Situação: Aprovado

Localização atual do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA