

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**

**Mestrado em Ciências da Saúde**

**Análise da resposta humoral anti-MOG e anti-HERV em amostras  
de líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com Esclerose  
Múltipla**

**Karin Cristina Garcia**

**São Paulo**

**2023**

**UNIVERSIDADE SANTO AMARO**  
**Mestrado em Ciências da Saúde**

**Análise da resposta humoral anti-MOG e anti-HERV em amostras  
de líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com Esclerose  
Múltipla**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Melo Neves

**São Paulo**

**2023**

G199a Garcia, Karin Cristina.  
Análise de resposta humoral anti-MOG e anti-HERV em amostras de líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com esclerose múltipla / Karin Cristina Garcia. – 2023.  
53 p.  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali.  
Dissertação. (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Santo Amaro, 2023.  
Bibliografia incluída.  
1. Resposta Humoral. 2. Líquido Cefalorraquidiano. 3. HERV-W. 4. HERV-K. 5. Glicoproteína de Oligodendrócitos de Mielina. 6. Esclerose Múltipla. I. Nali, Luiz Henrique da Silva. II. Universidade Santo Amaro. III. Título.  
CDD 616

Elaborada por Elisângela Silva Herênio CRB-8/6839



**Dedico esse trabalho aos meus pais: Sonia e Vladimir.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus , aos meus pais ,à minha irmã e aos meus sobrinhos pelo apoio incondicional para que eu realizasse esse mestrado.

Agradeço à minha chefe Dra Elizabeth Maria de Alcantara Rotondi , aos meus colegas de setor Hematologia /Citologia – Lab Central /Unifesp, por me cobrirem para realizar esse mestrado.

Agradeço ao Prof Dr Sandro Luiz de Andrade de Matas , pela ideia da capitação dessas amostras, por me apresentar à equipe do Lab Senne Líquor ,agradeço à supervisora Dayane e seus colaboradores por separarem as amostras para realização desse projeto.

Agradeço à UNISA por fazer parte da minha formação acadêmica como biomédica, e agora como Mestre.

Agradeço à coordenadora Profa Dra Carolina Nunes França por toda ajuda no mestrado.

Agradeço os amigos que fiz nesse mestrado : Fernanda , Erica , Lucas e Sara.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali por toda dedicação e apoio comigo durante esses dois anos.

Agradeço à Prof. Dra. Marina Tiemi Shio pela orientação para realização dos ELISAS desse projeto, assim como pelos cálculos estatísticos.

Gostaria de agradecer aos colegas de laboratório URC-LMCBio, que foram fundamentais para que eu conseguisse realizar todas as partes experimentais desse projeto. Principalmente ao aluno de iniciação científica vinculado a esse projeto Samuel Nascimento Santos.

Gostaria de agradecer a Dra. Maria Aparecida Juliano, por ter cedido os peptídeos usados no projeto.

Vai Corinthians !!!

## Resumo

**Introdução:** A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante crônica do sistema nervoso central (SNC). Caracteriza-se clinicamente pelo aparecimento de lesões desmielinizantes disseminadas no tempo e espaço. É uma doença que resulta em considerável incapacidade motora em adultos e apresenta maior frequência em mulheres. A EM não apresenta etiologia definida, porém postula-se que o Retrovírus Endógeno Humano da família W (HERV-W) possa apresentar papel fundamental na patogênese da doença. A patogênese da desmielinização é mediada por anticorpos e resposta celular direta, o que resulta com perda de oligodendrócitos e dano axonal. Acredita-se que a EM resulte de uma resposta autoimune às proteínas expressas em oligodendrócitos. A glicoproteína oligodendrócitos da mielina (MOG) é um antígeno alvo ambas as células dirigidas ao SNC humoral e celular. Importaneamente, os HERVs apresentam regiões de similaridade com a proteína MOG, e desta forma postula-se que os HERVs possam induzir a autoimunidade através do mecanismo de mimetismo molecular, induzindo uma resposta humoral cruzada entre MOG e HERV-W.

**Objetivo:** Avaliar a resposta humoral anti peptídeos de HERV-W e K em LCR e soro de pacientes com Esclerose Múltipla

**Métodos:** Esse é um estudo retrospectivo transversal do tipo caso controle. 25 amostras de soro e LCR de pacientes com Esclerose Múltipla (ao menos 2 Bandas oligoclonais positivas (BOC) e 25 amostras de LCR de pseudotumor compuseram o grupo controle(GC) . Essas amostras foram doadas pelo laboratório Senne Liquor. Foram realizados contagem global e diferencial do LCR, dosagens bioquímicas e Banda Oligoclonal. Para detecção de resposta humoral anti HERV e anti MOG ,um ensaio de ELISA in-house foi padronizado e utilizado .

**Resultados:** A análise do LCR demonstrou pelo índice de IgG e BOC tipo 2 e 3, a síntese intratecal de anticorpos. O ensaio de ELISA anti-HERV-K e W revelou maiores concentrações de IgG anti MOG e HERV-W nos LCRS com EM em comparação com GC ( $p < 0,001$  e  $p < 0,0142$  respectivamente), com relação análise do HERV-K, os resultados revelaram maior resposta humoral para três peptídeos de HERV-K ( $p = 0,0007$  ;  $p = 0,0009$  ;  $p < 0,0001$  ). E no soro EM resposta humoral para anti MOG ( $p = 0,0119$ ), para HERV-W ( $p < 0,0001$  ), para quatro peptídeos de HERV-K (  $p = 0,0006$  ;  $p = 0,0100$  ;  $p = 0,0086$  ;  $p < 0,0001$  ) Demostramos também correlação positiva entre LCR e soro dos pacientes com EM para: MOG ( $p = 0,0170$  e  $r = 0,4728$  ),HERV-W( $p < 0,0001$   $r = 0,7240$  ), HERV-K pol (peptídeos 05:  $p = 0,0126$   $r = 0,4914$ ; peptídeo 6:  $p = 0,0025$  e  $r = 0,5780$  ; peptídeo 7:  $p = 0,0010$  e  $r = 0,6178$ ).

**Conclusão:** Pacientes com EM apresentam maiores níveis de resposta intratecal anti-HERV-W diversas regiões de K em LCR. E os níveis de anticorpos anti esses mesmos peptídeos correlacionam-se positivamente no soro e no LCR.

**Palavras-chaves:** Resposta Humoral, Líquido Cefalorraquidiano, HERV-W, HERV-K, Glicoproteína de Oligodendrócitos, Esclerose Múltipla.

## Abstract

**Introduction:** Multiple Sclerosis (MS) is a chronic demyelinating autoimmune disease of the central nervous system (CNS). It is clinically characterized by the appearance of demyelinating lesions disseminated in time and space. It is a disease that results in considerable motor disability in adults and is more common in women. MS has no defined etiology, but it is postulated that the Human Endogenous Retrovirus of the W family (HERV-W) may play a fundamental role in the pathogenesis of the disease. The pathogenesis of demyelination is mediated by antibodies and direct cellular response, which results in loss of oligodendrocytes and axonal damage. MS is believed to result from an autoimmune response to proteins expressed in oligodendrocytes. Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a humoral and cellular CNS-directed cell target antigen. Importantly, HERVs present regions of similarity with the MOG protein, and thus it is postulated that HERVs can induce autoimmunity through the mechanism of molecular mimicry, inducing a cross-humoral response between MOG and HERV-W.

**Objective:** To evaluate the humoral response to HERV-W and K peptides in CSF and serum of patients with Multiple Sclerosis

**Methods:** This is a retrospective cross-sectional case-control study. 25 serum and CSF samples from patients with Multiple Sclerosis (at least 2 positive oligoclonal bands (BOC) and 25 pseudotumor CSF samples made up the control group (GC). These samples were donated by the Senne Liquor laboratory. Global counting and CSF differential, biochemical measurements and Oligoclonal Band To detect anti-HERV and anti-MOG humoral responses, an in-house ELISA assay was standardized and used.

**Results:** CSF analysis demonstrated the intrathecal synthesis of antibodies through the IgG and BOC type 2 and 3 index. The anti-HERV-K and W ELISA assay revealed higher concentrations of anti-MOG and HERV-W IgG in LCRS with MS compared to GC ( $p < 0.001$  and  $p < 0.0142$  respectively), in relation to HERV-K analysis, the results revealed a greater humoral response to three HERV-K peptides ( $p = 0.0007$ ;  $p = 0.0009$ ;  $p < 0.0001$ ). And in serum EM humoral response to anti MOG ( $p = 0.0119$ ), to HERV-W ( $p < 0.0001$ ), to four HERV-K peptides ( $p = 0.0006$ ;  $p = 0.0100$ ;  $p = 0.0086$ ;  $p < 0.0001$ ) We also demonstrated a positive correlation between CSF and serum of patients with MS for: MOG ( $p = 0.0170$  and  $r = 0.4728$ ), HERV-W ( $p < 0.0001$   $r = 0.7240$ ), HERV-K pol (peptides 05:  $p = 0.0126$   $r = 0.4914$ ; peptide 6:  $p = 0.0025$  and  $r = 0.5780$ ; peptide 7:  $p = 0.0010$  and  $r = 0.6178$ ).

**Conclusion:** Patients with MS show higher levels of intrathecal anti-HERV-W response to several K regions in CSF. And the levels of antibodies against these same peptides correlate positively in serum and CSF.

**Keywords:** Humoral Response, Cerebrospinal fluid, HERV-W, HERV-K, Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, Multiple Sclerosis.

## Lista de Figuras

Figura 1: Gel de eletroforese das bandas oligoclonais (BOC), mostra as bandas correspondentes no soro (a esquerda) com as setas correspondentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (a direita)..... 33

Figura 2 Comparação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) e pep 01 (B) (HERV-W) no LCR (Líquido cefalorraquidiano) do grupo controle (HII -pseudotumor ) e grupo da EM ( esclerose múltipla)..... 35

Figura 3 Comparação dos peptídeos do HERV-K (Pep 02 (A) ,05 (B), 06 (C) ,07 (D) 08(E) , no LCR (líquido cefalorraquidiano) no grupo controle HII ( pseudotumor ) e no grupo EM ( Esclerose Múltipla) ..... 37

Figura 4. Comparação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) Pep 01 (B) (HERV-W) e os peptídeos da família K (02 (C),05 (D),06 (E),07(F),08 (G)) no soro dos pacientes de esclerose múltipla (grupo EM ,soro positivo ) e soro negativo (grupos de doadores ) ..... 38

Figura 5 : Correlação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) Pep 01 (B) (HERV-W) e os peptídeos da família K (02, (C),05 (D),06 (E),07 (F),08 (G) ) no LCR e soro dos pacientes de esclerose múltipla . ..... 41

## Lista de Tabelas

Tabela 1 Dados demográficos das amostras e citologia, bioquímica, BOC do grupo da esclerose múltipla (GEM) e do grupo controle (GHII). LCR: líquido cefalorraquidiano, IgG: imunoglobulina IgG, BOC (bandas oligoclonais).....	31
Tabela 2. Comparação entre os Peptídeos HERV sintetizados e a MOG. ....	33

## Lista de Abreviaturas

BOC:	Bandas oligoclonais
CIS:	Síndrome clinicamente isolada
DIS:	Disseminação no espaço
DIT:	Disseminação no tempo
EBV:	Vírus Epstein Barr
env:	Envelope
ELA:	Esclerose amiotrófica lateral
EM:	Esclerose Múltipla
EMRR:	Esclerose Múltipla Remitente Recorrente
EMSP:	Esclerose Múltipla secundaria progressiva
EMPP:	Esclerose Múltipla progressiva primaria
ELISA:	Teste sorológico imunoenzimatico
gag:	group specific antigen
GHII:	Grupo do pseudotumor
GEM:	Grupo da Esclerose Múltipla
HBTU:	N,N'-tetrametil-O-benzotriazo-1-ilurônio tetrafluoroborato
HERVs:	Retrovírus Endógenos Humano
HERV-W:	Retrovírus endógenos humano família W
HERV-K:	Retrovírus endógenos humano família K
HERV-H:	Retrovírus endógenos humano família H

HHV-6: Herpes vírus 6

HOBt: 1-hidroxibenzotriazo

IgG: Imunoglobulina G

LCR: Líquido cefalorraquidiano ( líquido)

LTRs: Repetição terminal longa

MBP-1: Proteína básica de mielina -1

MOG: Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos

MSRV: Retrovírus associado a Esclerose Múltipla

NCBI : *National Center for Biotechnology Information*

ORFs: Fases abertas de leitura

PBS: Tampão fosfato salino

PEP: Peptídeo

PLP: Proteína proteolítica

pol: Transcriptase reversa e integrase

pro: Protease

PRMS: Esclerose Múltipla redicivante progressiva

SNC: Sistema Nervoso Central

RM: Ressonância magnética

TLR: Toll- like receptor

tRNA: RNA transportador

## **Sumário**

<b>1.0</b>	<b>Introdução:</b>	<b>14</b>
<b>1.1</b>	<b>Esclerose Múltipla</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Patogênese da doença e classificação da EM</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Diagnóstico da Esclerose Múltipla</b>	<b>16</b>
<b>1.3</b>	<b>O papel das bandas oligoclonais (BOCs) na Esclerose Múltipla</b>	<b>17</b>
<b>1.4</b>	<b>Etiologia da Esclerose Múltipla – um possível papel infeccioso?</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Os HERVs e seu papel na Esclerose Múltipla</b>	<b>18</b>
<b>1.5.1</b>	<b>HERV s</b>	<b>18</b>
<b>1.5.2</b>	<b>HERW–W e a Esclerose Múltipla</b>	<b>20</b>
<b>1.5.3</b>	<b>HERV-K e seu papel em doenças autoimunes e neurológicas</b>	<b>21</b>
<b>1.6</b>	<b>A importância da MOG na patogênese da doença</b>	<b>22</b>
<b>2.0</b>	<b>Justificativa</b>	<b>24</b>
<b>3.0</b>	<b>Objetivos</b>	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>25</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>25</b>
<b>4.0</b>	<b>Métodos</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Tipo de trabalho</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>População do estudo e aspectos éticos</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Critérios de inclusão e exclusão de amostras</b>	<b>27</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises do LCR</b>	<b>27</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Citologia do LCR</b>	<b>27</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Testes Bioquímicos</b>	<b>27</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Bandas Oligoclonais</b>	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Síntese dos Peptídeos de HERV W, K e MOG</b>	<b>28</b>
<b>4.6</b>	<b>Ensaio de ELISA Anti-HERV-W e Anti-MOG</b>	<b>30</b>
<b>4.7</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>30</b>
<b>5.0</b>	<b>Resultados</b>	<b>31</b>
<b>6.0</b>	<b>Discussão</b>	<b>41</b>
<b>7.0</b>	<b>Conclusão</b>	<b>43</b>
<b>8.0</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>	<b>44</b>
	<b>Anexos</b>	<b>53</b>

## **1.0 Introdução:**

### **1.1 Esclerose Múltipla**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante crônica do sistema nervoso central (SNC) é uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica em adultos jovens, afeta em maior frequência as mulheres <sup>1</sup>. A etiologia da EM é desconhecida, porém ela pode ser caracterizada como uma doença multifatorial, onde há fatores genéticos associados a fatores ambientais.

Diversos foram os elementos pesquisados: o gradiente latitudinal na prevalência da EM está fortemente relacionado à exposição aos raios solares<sup>1</sup>, que estimula a produção cutânea da vitamina D <sup>2</sup>, fumar aumenta o risco de EM, as infecções virais (3) e suscetibilidade genética associada ao gene para HLA-DRB, uma razão de chance de EM para homocigotos de > 3 e homocigotos > 6 <sup>1,4</sup> são capazes de desencadear resposta imunogênica da doença <sup>5</sup>.

As manifestações clínicas dependem da área do SNC afetada, e importante destacar que qualquer área do SNC pode ser afetada. Dentre as manifestações, podemos destacar: alteração de memória, visão e dificuldades nas atividades diárias. As manifestações clínicas da EM são caracterizadas por alta variabilidade interindividual com gravidade e duração dos sintomas dependendo da extensão do dano neurológico <sup>5</sup>. No entanto, a doença pode ter perfil progressivo.

O diagnóstico da EM é complexo devido a heterogeneidade da doença. Os critérios diagnósticos baseiam-se principalmente na avaliação dos achados clínicos, resultados e exames de imagem e laboratoriais <sup>6</sup>.

### **1.2 Patogênese da doença e classificação da EM**

A principal característica patológica da EM é representada pela quebra da barreira hematoencefálica, a subsequente infiltração do SNC por linfócitos autorreativos seguida de desmielinização, inflamação focal e a eventual culminação em perda axonal, gliose e atrofia da substância branca e cinzenta <sup>7,8</sup>.

O sistema imunológico desempenha um papel importante. A síntese intratecal de imunoglobulinas, em especial IgG, expressão de uma resposta imune alterada pelas

células T e células plasmáticas, causam a inflamação do SNC, perda da mielina e morte das células dos oligodendrócitos <sup>9</sup>.

Os macrófagos promovem resposta pro-inflamatória das células T e B e executam danos nos tecidos. A ativação da micróglia pode ser um dos eventos iniciais no desenvolvimento das lesões da EM, através da secreção de citocinas pro-inflamatórias, quimiocinas, radicais livres e aumento da liberação do glutamato <sup>10</sup>.

As manifestações clínicas da EM são caracterizadas por períodos de remissão da doença seguidos por recaídas, definidas como episódios clínicos agudos ou subagudos com anormalidade neurológica de pelo menos 24 h. A EM é categorizada em quatro subtipos:

(a) EM remitente recorrente (EMRR) a forma mais comum, afetando 85 % de todos os pacientes com EM que envolve recidivas seguidas de remissão. Geralmente ocorre nos primeiros anos da doença com recuperação completa e sem sequelas. Os surtos duram dias ou semanas. Em média os surtos se repetem uma vez por ano, caso não inicie o tratamento adequado.

(b) EM secundária progressiva (EMSP) que desenvolve ao longo do tempo após o diagnóstico de EMRR; num prazo de 10 anos aproximadamente metade dos pacientes EMRR evolui para EMSP, não se recuperam mais dos surtos e acumulam sequelas (perda visual, dificuldade de mobilidade).

(c) EM progressiva primária (EMPP) caracterizada pela deterioração neurológica contínua e gradual; em cerca de 10 % dos casos restantes, ocorre gradativa piora dos surtos.

(d) EM recidivante progressiva (PRMS, 5 % dos pacientes apresentam essa forma rápida e agressiva. Estão combinados a progressão paralela do processo desmielinizante e comprometimento mais precoce dos axônios <sup>5,9</sup>.

A primeira apresentação clínica da EM geralmente inicia-se como uma síndrome clinicamente isolada (CIS). Refere-se a um episódio neurológico que dura pelo menos 24 hs, causado por inflamação ou desmielinização <sup>9</sup>.

A EM afeta mais de 2,8 milhões de pessoas no mundo, com uma incidência que aumenta com as latitudes, sendo mínima no Equador e aumentando nas latitudes

norte ou sul, identificando o norte da Europa com área de alto risco (prevalência 140-250 por 100.000)<sup>11</sup>.

O Brasil estima-se que existam 40000 casos da doença, uma prevalência média de 15 casos para 100.000 habitantes, varia de acordo com a região de residência do paciente, sendo menor no Nordeste 1,36 por 100 mil habitantes, e maior na região Sul 27,2 por 100 mil habitantes<sup>12</sup>.

## **1.2 Diagnóstico da Esclerose Múltipla**

O diagnóstico da doença é baseado em critérios clínicos e exames laboratoriais bioquímicos e de imagem, descritos nos Critérios de Mc Donald<sup>13</sup>.

Nos critérios a necessidade de identificar a disseminação de lesões no espaço e tempo. A disseminação no espaço (DIS) é o desenvolvimento de lesões em áreas anatômicas distintas dentro do SNC. A disseminação no tempo (DIT) é representada pelo desenvolvimento de novas lesões do SNC ao longo do tempo. A identificação de DIS e DIT é importante porque a lesão única não é suficiente para diagnosticar a EM, assim como um único episódio da doença ao longo do tempo<sup>13</sup>.

Os critérios de McDonald foram desenvolvidos pela primeira vez em 2001 depois foram revisados várias vezes em 2005, 2010 e 2017.

Nos critérios de 2005<sup>13</sup> se as lesões desmielinizantes do SNC preencherem três dos quatro critérios de disseminação no espaço (DIS) da RM, elas podem ser substituídas por uma lesão clinicamente evidenciada. Se uma nova lesão preenche os critérios de disseminação no tempo (DIT) da RM, pode ser substituído por outro episódio clínico.

Nos critérios de 2010<sup>14</sup>, os critérios DIS e DIT são simplificados e enfatizam o diagnóstico precoce de EM com uma única presença de ressonância magnética de lesões assintomáticas.

Na revisão dos critérios de 2017<sup>6</sup> alterações foram feitas e os critérios de McDonald tornam-se muito mais fáceis de usar. As lesões sintomáticas e lesões corticais são incluídas nos critérios DIS. A presença de 2 bandas oligoclonais (BOC) de imunoglobulina G (IgG) específicas do LCR pode ser usada no lugar da demonstração

de DIT, possivelmente levando a um diagnóstico mais precoce. Com sensibilidade consideravelmente aumentada, os critérios McDonald de 2017 têm sido amplamente aplicados no contexto clínico, atualmente <sup>15</sup>.

### **1.3 O papel das bandas oligoclonais (BOCs) na Esclerose Múltipla**

Uma das principais características da EM estão associadas a achados no LCR, principalmente níveis elevados de IgG e a presença das BOCs que são fruto de produção de imunoglobulinas de vários clones de células B/plasmócitos secretando IgG no SNC <sup>16,17</sup>.

O índice de IgG é calculado pela dosagem da IgG total no LCR e soro, em relação à albumina sérica, em pessoas saudáveis, o índice de IgG é de 0,3-0,7. Um valor acima de 0,7 indica síntese intratecal de imunoglobulina G. Tais valores são observados na vasta maioria dos pacientes com EM (cerca de 90%) <sup>18</sup>.

Os anticorpos presentes no LCR de pacientes com EM são distintos e podem apresentar resposta contra a glicoproteína da mielina dos oligodendrócitos (MOG) e contra diversos agentes virais <sup>19-21</sup>.

Esses dados indicam que existe uma diversidade de resposta humoral, e talvez de antígenos virais circulantes no LCR de pacientes com EM, o que reforça a ideia de que a patogênese da EM pode ser complexa e talvez os gatilhos que estimulem a autoimunidade não necessariamente sejam específicos.

As BOCs são identificadas pela técnica de focalização isoelétrica e essas são classificadas em até 5 tipos dependendo da sua distribuição no LCR e no soro. Os principais tipos encontrados na EM são : tipo 2 ( exclusivas ao LCR) e tipo 3 ( no soro e no LCR ) <sup>18</sup>.

As bandas oligoclonais aparecem com mais frequência no LCR na fase inicial da doença e persistem durante todo o curso da doença independentemente do tratamento utilizado <sup>22</sup>.

### **1.4 Etiologia da Esclerose Múltipla – um possível papel infeccioso?**

Dentre os principais possíveis agentes etiológicos que possam estar associados a EM os agentes infecciosos tem representado como potenciais candidatos para exercer um papel em induzir uma resposta autoimune seja por quebra de tolerância ou mimetismo molecular. Dentre eles os vírus são os que acumulam maiores evidências. Inclusive, vários vírus foram hipotetizados para desempenhar um papel na autoimunidade da EM. Entre eles estão Raiva, Coronavírus, Sarampo, Torqueteno vírus, quase todos os vírus da família *Herpes viridae* (exceto Herpes 8), além da Parainfluenza <sup>3,23</sup>.

Entre os vírus da família *Herpes viridae*, o EBV tem sido estudado e muitas evidências apontam para suposto papel na patogênese da EM (24,25) já que os índices de anticorpos específicos para EBV são elevados no soro de Pacientes com EM (26,27).

Ainda entre a família herpes, o herpes 6 (HHV-6) pode causar ou promover a neuroinflamação da EM<sup>28</sup>, foi relatado sua presença nas placas da substância branca no cérebro da EM <sup>29</sup>, sua expressão nos oligodendrócitos<sup>30</sup>.

De forma mais recentes, Os Retrovírus Endógenos Humanos (HERVs) tem sido considerados como potenciais agentes etiológicos da doença. Uma série de evidências tem sido atribuídas a eles e esses serão descritos a seguir.

## **1.5 Os HERVs e seu papel na Esclerose Múltipla**

### **1.5.1 HERVs**

Os retrovírus endógenos (ERVs) foram originados através de infecções retrovirais ancestrais de todos os vertebrados infectando suas células germinativas milhões de anos atrás. Ao infectar as células da linhagem germinativa, eles foram capazes de se fixar nos genomas do hospedeiro e serem transmitidos através das gerações por herança mendeliana <sup>31,32</sup>. Devido à sua alta atividade transcricional e replicação, algum tempo após a integração, eles se espalham por meio de reinfecções, transmissão horizontal e retrotransposição <sup>33</sup>. Mais de 30 famílias de ERVs foram descritas e vários eventos independentes de integração ocorreram ao longo da evolução humana <sup>34</sup>.

Os ERVs humanos foram descritos pela primeira vez em 1970 e, após o sequenciamento do genoma humano, foi descrito que eles compõem 8% do genoma humano e, portanto, são chamados de retrovírus endógenos humanos (HERV) <sup>31,32,35</sup>.

Os HERVs são retrovírus simples, pois apresentam apenas os genes principais: gag, polimerase e envelope, flanqueados por duas regiões promotoras, conhecidas como *Long Terminal Repeats* (LTRs)<sup>36</sup>. A função desempenhada por cada: a proteína gag (antígeno específico de grupo) é geneticamente preservada e menos imunogênica que o envelope e é responsável pela produção do capsídeo viral <sup>36</sup>. O gene da polimerase (pol) codifica as enzimas virais não estruturais, incluindo a transcriptase reversa e a integrase. O gene do envelope (env) sintetiza as glicoproteínas do envelope e está sob ação mais forte pressões seletivas devido à maior exposição ao sistema imunológico do hospedeiro <sup>36</sup>. As LTRs estão localizadas em cada extremidade do provírus e compreendem as regiões U3, R e U5. A região U3 contém o promotor viral e os elementos potenciadores. A região R inclui o local de iniciação do mRNA (+1) e termina em um local de terminação de poliadenilação. <sup>37,38</sup> O nome de cada família ERV considera o sítio de ligação do primer onde se inicia a transcrição reversa <sup>39</sup>; por exemplo, o HERV que apresenta um triptofano como sítio de partida é denominado HERV-W <sup>35</sup>.

Os HERVs também são considerados elementos transponíveis, o que favoreceu a sua dispersão por diferentes sítios do genoma, porém muitos de seus genes estão incompletos, isolados espalhados pelo genoma assim como suas LTRs o que os tornaram altamente defectivos, o que impede que hoje esses vírus sejam transmitidos de forma horizontal, porém o vírion pode ser formado, isso é possível pela combinação das proteínas virais oriundas da expressão de diferentes sítios onde encontram seus genes <sup>40</sup>.

Embora a maioria dos genes HERVs sejam silenciados, eles desempenham um papel ativo na fisiologia humana, regulando genes (por exemplo amilase, endotelina-b, apolipoproteína-C1) <sup>41,42</sup> provendo a fusão durante a diferenciação celular e formação da placenta <sup>43</sup> esses HERVs também podem apresentar um papel na patogênese de doenças autoimunes, e dentre as principais famílias de HERV, o HERV-W é o que soma o maior número de evidências até então, e a doença mais estudada é a Esclerose Múltipla.

### 1.5.2 HERV-W e a Esclerose Múltipla

As primeiras evidências encontradas que vieram associar os HERVs, em especial o HERV-W com a doença datam do final dos anos 80, quando um vírus com atividade de transcriptase reversa foi isolado das células circulantes das leptomeninges no líquido cefalorraquidiano (LCR) em um paciente com EM. O vírus foi clonado e caracterizado, seus genes foram identificados e este novo retrovírus foi denominado Retrovírus Associado à Esclerose Múltipla (MSRV), que mais tarde se descobriu pertencer à família HERV-W <sup>38</sup>.

A expressão de RNA pol e env de MSRV foi confirmado na EM por estudos subsequentes <sup>44,45</sup> o seu nível de expressão foi associado à gravidade da EM <sup>46,47</sup> e a patogenicidade cerebral <sup>48</sup>. HERV-W gag e proteína env demonstraram estar aumentada em cérebros com EM <sup>48</sup> e capaz de ativar TLR4 (Toll-Like Receptor) e imunidade inata <sup>49</sup> e desmielinização do SNC <sup>50</sup>.

O HERV-W foi diretamente correlacionado com as proteínas CD14 e TLR4 para ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1b, IL 6 e TNF-a nos tecidos afetados <sup>51</sup>. A ativação do TLR4 também induz a produção de NO•, agravando o quadro de estresse nitrosativo/ oxidativo mediado pelo peroxinitrito (ONOO-) e outras ERO/RNS, e assim, promovendo prejuízo aos oligodendrócitos e desmielinização de neurônios motores <sup>52</sup>. Em particular, os efeitos das proteínas env HERV-W na EM podem envolver a ativação de vias imunes e facilitam uma resposta imune pró-inflamatória e superantigênica anormal <sup>53,54</sup>.

O mecanismo pelos quais os vírus podem induzir a autoimunidade incluem a expressão de superantígenos e mimetismo molecular <sup>55</sup>. O mimetismo molecular é um fenômeno pelo qual as moléculas de um patógeno, em particular os peptídeos, são semelhantes aos peptídeos de seu hospedeiro. As células T montam uma resposta imune quando são ativadas por peptídeos estranhos, mas normalmente não reagem contra peptídeos próprios. A hipótese do mimetismo molecular da autoimunidade propõe que as células T causam doenças autoimunes após uma resposta imune

patogênica quando reagem de forma cruzada com peptídeos próprios de tecidos saudáveis e não infectados <sup>56</sup>.

HERV-W e as proteínas da mielina, como MOG e Proteína Básica de Mielina -1 (MBP-1) compartilham pelo menos seis epítomos que podem potencialmente reagir de forma cruzada conduzindo resposta imune por meio de mimetismo molecular <sup>57-59</sup>.

Nesse contexto os HERVs podem atuar em ambos: codificando superantígenos, resultando assim em respostas inflamatórias aumentando ou imitando autoantígenos <sup>55,49</sup>.

### **1.5.3 HERV-K e seu papel em doenças autoimunes e neurológicas**

O vírus HERV-K é assim chamado porque usa lisina (K) tRNA como *primer binding site*. HERV-K apresenta milhares de inserções no genoma humano, e 11 sequências provirais amplamente completas foram identificadas até o momento <sup>60,61</sup> HERV -K foi relacionada a patogênese de doenças, como: Esclerose Amiotrófica Lateral (ELA) <sup>62</sup>, na artrite reumatoide <sup>63</sup>.

Foi descrito um aumento da expressão das famílias HERV-K e HERV-H no sangue, cérebro ou líquido cefalorraquidiano (LCR) de pessoas com EM, por alguns grupos <sup>64</sup>, mas não por outros <sup>65</sup>. Um membro variante alélico da família HERV-K, K18, foi recentemente considerado um fator de risco para EM <sup>66</sup>. Embora o pequeno tamanho da amostra tenha sido uma limitação, houve uma associação significativa entre o genótipo HERV K18 env e o risco de EM <sup>66</sup>. HERV-K18 env foi previamente descrito como um superantígeno transativado por EBV na patogênese do diabetes tipo 1 <sup>67</sup> Outro membro da família HERV-K, K113, com ORFs para todos os seus genes, tem uma ampla variação geográfica e étnica em 0-28% dos humanos, aumentando a possibilidade de sua associação com EM uma vez que a doença é talvez geograficamente e etnicamente restrita. No entanto, usando uma grande população de EM (n = 951) e pais não afetados (n = 1.902), não houve aumento significativo no alelo provírus HERV-K113 por análise de PCR <sup>68</sup>.

Assim, enquanto K18 mostra associação em um pequeno subconjunto de pacientes com EM um estudo maior com outro membro HERV-K, K113, não revela diferenças significativas; disparidades tanto no número de pacientes examinados quanto no

genótipo HERV-K tornam essa associação inconclusiva <sup>69</sup>. Apesar dos achados interessantes para diversas doenças, a possível atuação do HERV-K pode estar presentes em diversas doenças, e de fato, faltam dados que apontem para essa associação entre o HERV-K e a patogênese da EM.

## **1.6 A importância da MOG na patogênese da doença**

A patologia da EM é caracterizada por inflamação, desmielinização, gliose e neurodegeneração, perda de oligodendrócitos e destruição da bainha de mielina <sup>70</sup>. Em uma proporção significativa de pacientes, a desmielinização parece ser mediada por anticorpos e complemento-dependente, com perda de oligodendrócitos e dano axonal <sup>71</sup>. Acredita-se que a EM resulte de uma resposta autoimune às proteínas expressas em oligodendrócitos ou a bainha de mielina <sup>72</sup>.

Brevemente, a mielina é uma proteína que compõe a bainha de forma multilamelar, e dessa forma isola os axônios dos neurônios; é formado pela elaboração de processos de oligodendrócitos ao redor dos axônios <sup>73</sup> os principais componentes proteicos da mielina, a proteína básica da mielina (MBP), a glicoproteína de oligodendrócitos da mielina (MOG) e a proteína proteolipídica (PLP), são autoantígenos eficazes e alvos de autoimunidade na EM <sup>74,75</sup>.

A glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) é um antígeno alvo para ambas as células dirigidas ao SNC humoral e celular, devido a localização extracelular de seu domínio tipo IgV nas lamelas de mielina mais externas, que se torna um alvo exposto acessível a ataque autoimunes iniciais em axônios mielinizados compactos <sup>76</sup>.

MOG preenche dois requisitos cruciais para se um antígeno alvo de anticorpos da desmielinização autoimune; sua localização exposta e suas propriedades imunogênicas com a MBP <sup>77</sup>.

As proteínas de MBP e PLP podem desempenhar um papel adicional na patogênese da EM, através da resposta do anticorpo a um componente de mielina levando a extensa desmielinização primária <sup>78</sup>.

Os pacientes que apresentam anticorpo MOG positivo, mostram uma elevação isolada da proteína básica da mielina indicativa de desmielinização primária do SNC <sup>79,80</sup>.

Além da ativação do complemento, a ligação do anticorpo anti-MOG ao MOG dentro da bainha de mielina pode facilitar seu reconhecimento pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) dentro do SNC, acelerando a destruição do tecido pelas células T, causando danos a bainha de mielina ou a disfunção dos oligodendrócitos <sup>81</sup>.

## 2.0 Justificativa

A esclerose múltipla (EM) é uma doença crônica, inflamatória e degenerativa do sistema nervoso central (SNC). Caracteriza-se pela formação multifocal e disseminada de lesões inflamatórias desmielinizantes levando a dano à mielina e perda de axônios e oligodendrócitos. A EM é uma das causas mais comuns de incapacidade neurológicas em jovens adultos.

Sua etiologia é desconhecida, é atribuída a vários fatores ambientais (vitamina D, latitude, dieta, tabagismo, obesidade, exposição solar), suscetibilidade genética e vírus. No entanto, nenhum agente infeccioso trouxe evidências os suficientes que fossem capazes de atribuir a etiologia da doença.

De maneira interessante, as BOCs representam achados laboratoriais frequentes nos indivíduos com EM. Nelas, podemos encontrar anticorpos específicos contra uma série de vírus, o que traz a ideia de que os agentes infecciosos podem se fato serem a chave para a etiologia da doença. Dessa forma, um outro vírus que tem demonstrado uma série de evidências que apontam para esse dado está relacionado ao Retrovírus Endógenos Humanos.

Os HERVs compõem 8% do genoma humano e diversas são as evidências que indicam para um possível papel dos HERVs na etiologia da doença. Os HERVs apresentam região de similaridade com a MOG e MBP-1, o que pode sugerir um mecanismo de resposta autoimune mediada por mimetismo molecular. Além disso, sabe-se que os HERVs são capazes de estimular processos inflamatórios.

No entanto, existem poucos estudos que buscaram compreender se há síntese intratecal de anticorpos anti-HERV. Explorar essa temática poderá trazer mais uma peça para esse quebra cabeça que buscam compreender o papel dos HERVS na patogênese da doença. Talvez, os dados obtidos nesse trabalho poderão servir de base para futuros estudos para fins terapêuticos ou que busquem possíveis biomarcadores para os quadros e manifestações da doença.

### **3.0 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar a frequência e nível de resposta humoral anti-MOG e anti-HERV em as amostras de LCR e soro de pacientes com Esclerose Múltipla.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Comparar os níveis de resposta humoral anti-HERV e anti-MOG em soro e LCR de pacientes com EM.
- Correlacionar à resposta humoral anti-MOG aos peptídeos HERV-W e -K no LCR e soro da EM
- Comparar os níveis de resposta humoral entre as diferentes regiões de HERV-W e K

## **4.0 Métodos**

### **4.1 Tipo de trabalho**

Esse é um estudo retrospectivo transversal do tipo caso controle.

### **4.2 População do estudo e aspectos éticos**

Para captação das amostras e desenvolvimento do estudo proposto, formamos uma parceria com o Laboratório Senne Liquor, laboratório especializado em análises diversas em LCR.

Sendo assim, 25 amostras de LCR e de soro de pacientes com Esclerose Múltipla e 25 amostras de LCR com Pseudotumor foram utilizados nesse estudo. O presente estudo foi composto por dois grupos, os de pacientes com Esclerose Múltipla (GMS) e de pseudotumor (GHII), como grupo controle.

Para o grupo controle foi utilizado amostras de pseudotumor (Hipertensão intracraniana idiopática) pacientes que realizam coletas de LCR para diminuição da pressão intracraniana, cuja composição do LCR é normal <sup>82</sup>.

As amostras de LCR a serem incluídas nesse estudo, foram colhidas em virtude de indicação de neurologistas para fins de diagnósticos das doenças suspeitas e não foram coletadas com a finalidade de serem utilizadas para esse estudo.

Cerca de 2ml de LCR e 1,5ml de soro foram encaminhados para o laboratório de pesquisa da UNISA para a realização das etapas experimentais. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento de sua utilização.

As alíquotas das amostras a serem captadas no laboratório Senne foram identificadas por código alfa numéricos que representa o registro interno do laboratório, de forma a preservar a identidade dos pacientes.

O trabalho foi aprovado no CEP sob parecer 55272749 em 09/08/2022.

Adicionalmente as amostras alguns dados demográficos também foram obtidos: sexo, idade, e o resultado da banda oligoclonal.

Para determinar a resposta humoral no soro dos pacientes de Esclerose Múltipla (grupo EM ) ao peptídeo antigênico HERVs famílias W (01) e K (02,05,06,07,08), e da MOG , foram utilizados como controle negativo soros de doadores saudáveis (com idade entre 06 e 62 anos) de dois diferentes bancos de soros coletados e também aprovados pelo o CEP (5.152.962 e 056466/2020),

### **3 Critérios de inclusão e exclusão de amostras.**

Foram incluídas nesse estudo: amostras que tinham como indicação clínica e suspeita de Esclerose Múltipla, que apresentavam resultado de banda oligoclonal (BOC) positiva e amostras com diagnóstico de pseudotumor. As amostras incluídas tinham no máximo 6 meses de tempo de coleta.

Foram excluídas amostras que não apresentaram BOC positiva, ou que não se enquadraram no diagnóstico de pseudotumor, que tinham volume insuficiente para as análises.

## **4.4 Análises do LCR**

### **4.4.1 Citologia do LCR**

Foi realizada contagem global na câmara de Fuchs-Rosenthal e diferencial dos neutrófilos, quando contagem global for maior e igual a 4 células /mm<sup>3</sup>. Para o diferencial de neutrófilos fez –se o uso de citocentrífuga para confecção de lâmina e coloração de Leishman. Neutrófilos foram contados na lâmina com uso de um contador e se diferenciaram em neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos, plasmócitos e macrófagos.

### **4.4.2 Testes Bioquímicos**

Os parâmetros bioquímicos do LCR, foram dosados pelo método colorimétrico enzimático: a proteína total (valor de referência: punção lombar até 45 mg/dl lombar) a glicose (2/3 (60%) da glicemia sérica (aproximadamente 50 a 70 mg/dl) e o lactato (valor de referência entre 10,8 a 19,6 mg/dl). Os valores de referência são os adotados pelo Laboratório Senne.

Foram realizadas as dosagens quantitativas de Ig e albumina e uma análise qualitativa da Ig do LCR em comparação com a Ig sérica <sup>83</sup>. Albumina e IgG foram determinadas por nefelometria. O índice de IgG foi calculado:  $[\text{IgG total (LCR)} \times \text{albumina (soro)}] / [\text{IgG (soro)} \times \text{albumina (LCR)}] \times 100$ .

#### **4.4.3 Bandas Oligoclonais**

Eletroforese do LCR com bandas oligoclonais que é o método que consiste em visualizar as imunoglobulinas no LCR a fim de que sejam comparadas com a imunoglobulinas do soro do paciente. Através da técnica de focalização elétrica forma-se um gradiente de pH que é gerado e mantido no gel por anfólitos sintéticos (tampões que aderem à agarose e que tem postos isoelétricos diferentes). Proteínas não concentradas no LCR são colocadas neste gradiente migram eletroforeticamente até que alcancem seus pontos isoelétricos, onde as proteínas serão focadas. Após a separação das proteínas é necessário visualizar as bandas.

A identificação de BOCs por focalização isoelétrica considerada o método mais sensível para detectar a síntese intratecal de IgG <sup>84</sup>.

De acordo com os critérios estabelecidos há cinco possíveis interpretações padronizadas, como se seguem: tipo 1 – normal; tipo 2 – BOC em LCR e não no soro; tipo 3 – BOC no LCR e no soro, mas com mais bandas no LCR que no soro; tipo 4 – com as mesmas BOCs no LCR e no soro; tipo 5 – com bandas monoclonais no LCR e no soro. O número de bandas não é levado em consideração, mas a correspondência de bandas entre soro e LCR, o que explica porque esse método é qualitativo e não quantitativo <sup>85</sup>.

Os tipos 2 e 3 comumente indicam síntese intratecal de IgG, o tipo 4 revela uma inflamação sistêmica na qual anticorpos do soro atravessam a barreira hematoencefálica e o tipo 5 é encontrado em paraproteinemias sistêmicas <sup>86</sup>.

#### **4.4 Síntese dos Peptídeos de HERV W, K e MOG**

Os peptídeos foram sintetizados por Flose, B. R. <sup>87</sup>. Que participa do nosso grupo e analisou a similaridade entre a sequência do HERV-K e HERV-W nas proteínas da

MOG, os peptídeos selecionados tinham mais de 50% de similaridade, para que houvesse resposta humoral, os peptídeos não podiam ser próximos de 100% de similaridade, senão o organismo poderia considerar como próprio e não geraria uma resposta a esse peptídeo. Também foi selecionado apenas os peptídeos que possuíam mais de 5 aminoácidos, isso porque peptídeos menores poderiam não ser sintetizados pelo seu tamanho e acabariam também gerando uma resposta inespecífica. Além disso foi analisado a localização da sequência do peptídeo dentro da estrutura da proteína para que fosse possível selecionar peptídeos que estão localizados externamente a membrana e que gerariam uma resposta humoral.

HERV-K pol (número de acesso: M14123.1) e HERV-W Env (número de acesso: AAI37382.1) sequências de proteínas relacionadas à Esclerose Múltipla, mais especificamente a MOG (número de acesso: CAA52617. 1) foram identificados no banco de dados online do National Center for Biotechnology Information (NCBI – GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>). A análise foi realizada usando algoritmos publicamente disponíveis(88). Sequências de aminoácidos do peptídeo foram selecionadas se apresentassem 50% ou mais de similaridade com MOG . Os peptídeos foram sintetizados pela fase sólida 9-fluorenilmetiloxycarbonila, em um sintetizador automatizado de múltiplos peptídeos (sistema PSSM-8; Shimadzu, Tóquio, Japão), conforme descrito anteriormente <sup>89,90</sup>.

Para a síntese foi utilizado o reagente de acoplamento HBTU (N,N'-tetrametil-O-benzotriazo-1-ilurônio tetrafluoroborato) / HOBt (1-hidroxibenzotriazol), em uma resina NovaSyn® TGR (Millipore, EUA). A seguir, a resina foi lavada com TFA:tioanisole:1,2-etanoditiol:água (85:5:3:7) para remoção dos peptídeos, seguida de uma etapa de purificação por HPLC semi-preparativa em coluna C18 (Econosil™ Fisher Scientific, EUA). O peso molecular e a pureza dos peptídeos (>95%) foram verificados por cromatografia de fase reversa e por espectrometria de massa (Shimadzu, Japão). Importante, os peptídeos foram sintetizados e cordialmente doados a nós pela Professora Maria Aparecida Juliano, da Universidade Federal de São Paulo.

#### **4.6 Ensaio de ELISA Anti-HERV-W e Anti-MOG**

O ensaio de Elisa foi padronizado por Flose, B.R. (87) , placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Thermo) que foram revestidas com 25 µl de peptídeos (20 µg/ml) diluídos em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9,6) e colocados em câmara fria, incubados à 4 °C. Após 24 horas, os poços foram bloqueados por uma hora com 3% de soro fetal bovino (FBS) em tampão de lavagem (PBS com 0,1% de Tween-20). 25 µl de amostras de soro, diluídas 1:500 em PBS e LCR diluídas 1:2 foram adicionados aos poços por 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com anti-IgG Humana conjugada a peroxidase (Sigma) diluída em PBS-Tween 0,1% e Soro Fetal Bovino 1% (1:5000). Após três lavagens com PBS-Tween 0,1%, 50 µl de ABTS 1 mg/ml em tampão citrato 0,1 M, pH 4,0 (sigma) e peróxido de hidrogênio foram adicionados por poço e parados com 1M HCl e lidos no leitor ELISA (Loccus, LMR-96) a 405 nanômetros.

#### **4.7 Análises estatísticas**

Os dados coletados foram inseridos em banco de dados construído no programa GraphPad Prism versão 6.0 (La Jolla, California) e avaliados por meio de estatística descritiva com cálculos percentuais, frequências e médias assim como a elaboração dos gráficos.

Para a comparação dos escores dos diferentes grupos, foi utilizado o teste de normalidade,  $p \leq 0,05$ , foi escolhido o teste de Mann –Whitney (não paramétrico)

Para a correlação do LCR e soro, foi utilizado a regressão linear e teste de correlação de Pearson.

Todos os testes foram realizados sob a admissão de probabilidade de erro de primeira espécie (alfa) de 5%.

## 5.0 Resultados

Foram coletadas 25 amostras de LCR e soro de pacientes com Esclerose Múltipla, e 25 amostras de LCR de pacientes com pseudotumor, os dados demográficos das amostras e a citologia, bioquímica, Índice IgG e BOC, a seguir:

Tabela 1 Dados demográficos das amostras e citologia, bioquímica, BOC do grupo da esclerose múltipla (GEM) e do grupo controle (GHII). LCR: líquido cefalorraquidiano, IgG: imunoglobulina IgG, BOC (bandas oligoclonais).

Parâmetros	GEM	GHII
Idade (anos)	34,8 ± 17,04	33,28 ±14,41
Sexo:		
Feminino	18	20
Masculino	7	5
Citologia Global LCR:		
Leucócitos	5,41 ±6,23	1,2 ±1,75
Hemácias	31,71 ±85,05	79,8 ±383,4
Diferencial LCR:		
Linfócitos	91,7 ±4,37	68,3 ±37,64
Bioquímica:		
Proteína mg/dl	32,3 ±10,91	29,8 ±13,0
Glicose mg/dl	58,3 ±20,58	58,3±11,59
Lactato mg/dl	12,3 ±4,45	13,38 ±2,60
Índice IgG	1,0 ±0,5	
BOC:		
tipo 02	20 (80%)	
tipo 03	5 (220%)	
Quantidade BOC:		
2 a 7	9 (36%)	
Acima de 8	16 (64%)	

Em ambos os grupos idade média semelhante, com desvio de 17,04 e 14,41 para o grupo esclerose e pseudotumor, respectivamente, devido cada grupo possuir 2 crianças com idade no grupo EM de 05 e 06 anos; no grupo controle 04 e 07 anos. Predomínio do sexo feminino em ambos os grupos.

Na contagem global de leucócitos o grupo controle, com número normal de leucócitos (baixo de 4 /mm<sup>3</sup>) e no grupo da EM levemente aumentado (5,41 ±6,23). Em relação a contagem global das hemácias 31,71 ±85,05 no grupo EM, e 79,8 ±383,4 no grupo HII, deve-se a acidente de punção na hora da coleta. Na contagem diferencial ambos

os grupos apresentam predomínio de linfócitos grupo EM  $91,7 \pm 4,37$  e no grupo controle  $68,3 \pm 37,64$ .

O resultado das dosagens bioquímicas se encontram dentro da normalidade para ambos os grupos: proteína total (valor de referência: para punção lombar até 45 mg/dl) grupo EM  $32,3 \pm 10,91$  mg/dL ; grupo controle :  $29,8 \pm 13,0$  mg/dL. Para a glicose (valor de referência de 50 a 70 mg/dL) e grupo EM  $58,3 \pm 20,58$  mg/dL; grupo controle  $58,3 \pm 11,59$  mg/dL o lactato (valor de referência 10,8 a 19,6 mg/dL)) grupo EM  $12,3 \pm 4,45$  mg/dl; grupo controle  $13,38 \pm 2,60$  mg/dL.

O índice de IgG, avalia a produção de IgG intratecal e é calculado a partir do IgG analisado no soro e no LCR. é realizado somente no grupo da EM ( $1,0 \pm 0,5$ ) o índice acima de 0,7 indica a síntese de IgG no SNC.

Na avaliação da BOC o tipo com maior predomínio (80%) tipo 02, compreende 2 ou mais bandas no LCR não no soro, tipo 03 (20%) com bandas no LCR e no soro. Os tipos mais comuns na EM.

Em relação ao número de bandas: 64% das amostras apresentam acima de 08 bandas na BOC, e 36 % das amostras apresentam 2 a 7 bandas na BOC. Como mostra a figura seguir de um gel de agarose de BOC desse estudo.

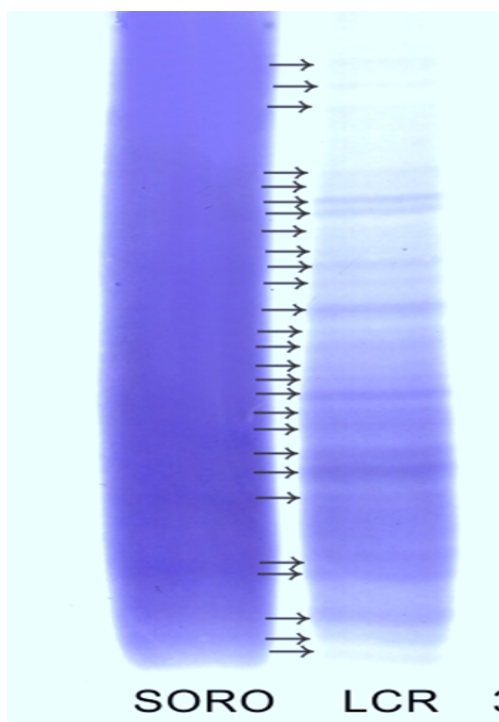


Figura 1: Gel de eletroforese das bandas oligoclonais (BOC), mostra as bandas correspondentes no soro (a esquerda) com as setas correspondentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (a direita)

Os peptídeos sintetizados por Flose, B.R. (87) foram comparados com a sequência da glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) (CAA52617.1), para visualizar a presença de uma região de similaridade (Tabela 2). Para realizar esta análise, a sequência MOG em Gen/Bank foi selecionada e analisada no site ExPASy. Os parâmetros utilizados foram: matriz de comparação BLOSUM62 e 100 alinhamentos foram computados. Houve cerca de 50-80% de similaridade entre os peptídeos e a sequência MOG (Tabela 2)

Tabela 2. Comparação entre os Peptídeos HERV sintetizados e a MOG.

Peptideo	Posição No peptideo	Posição No HERV	% ; #aa	Pontuação	Posição No MOG	Resíduos de MOG
<sup>1</sup> LVGPLVSNL	1	LVGPL VS	57,1 ;7	24.0	217	VLGPLVA

2	PWEWGEKGIS TP	9	<b>ISTP</b>	50,0 4	11,0	4	<b>LSRP</b>
5	WSGNQTLETR D	3	<b>GNQTL</b> <b>ETR</b>	50,0 9	17,0	88	<b>GDQAPEYR</b>
6	LGIPTYAMS	4	<b>PTYAM</b> <b>S</b>	50,0 6	14,0	147	<b>PFYWVS</b>
7	ECVANSAVIL	7	<b>AVIL</b>	50,0 4	11,0	223	<b>ALII</b>
		5	<b>PSFGR</b>	60,0 5	17,0	71	<b>PPFSR</b>
8	VTHVPSFR	4	<b>VPSFG</b>	60,0 5	15,0	215	<b>VPVLG</b>
		2	<b>THVPS</b> <b>FGR</b>	50,0 8	14,0	196	<b>TFDPHFLR</b>

A tabela mostra que os peptídeos 1 são de HERV-W e 2-8 são de HERV-K, sequência de peptídeos sintetizados (Peptídeo), resíduos semelhantes na sequência de HERV e MOG (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) estão em negrito, porcentagem de similaridade (%), número de resíduos semelhantes (#a, aa)

Para determinar a resposta humoral no LCR ao peptídeo antigênico HERVs famílias W (01) e K (02,05,06,07,08), e do MOG foram utilizados nos LCRs do grupo da EM e do grupo pseudotumor (HII). O Elisa foi realizado utilizando 25 µl de peptídeos (20 µg/ml) de peptídeos para revestir os poços com diluição 1:2 do LCR.

Observa-se resposta humoral anti MOG e HERV-W nos 2 grupos ( $p < 0,001$  e  $p = 0,0142$  respectivamente) em relação ao HERV-K houve resposta humoral nos peptídeos 06 , 07 , 08 ( $p = 0,0007$ ;  $p = 0,0009$ ;  $p < 0,0001$ ); não houve resposta humoral ao HERV-K nos peptídeos 05 ( $p = 0,0816$ ) e 02 ( $p = 0,0574$ ). Conforme a seguir:

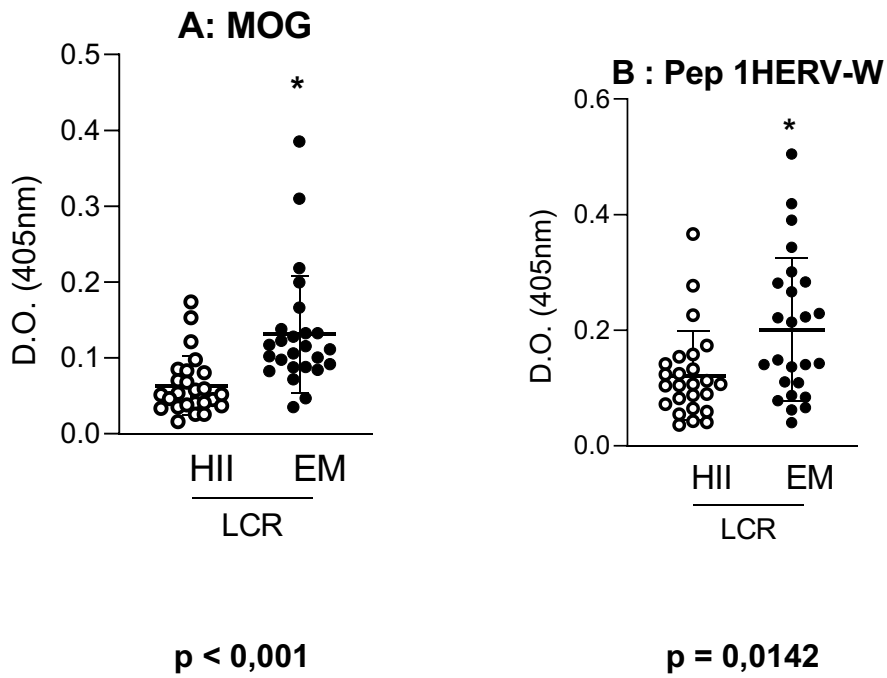
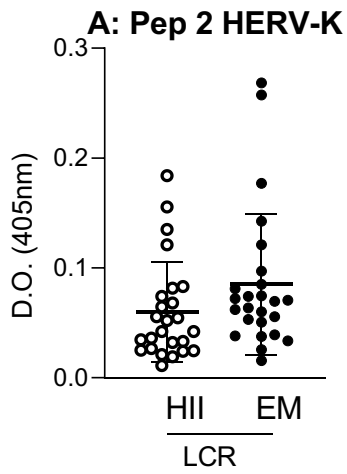
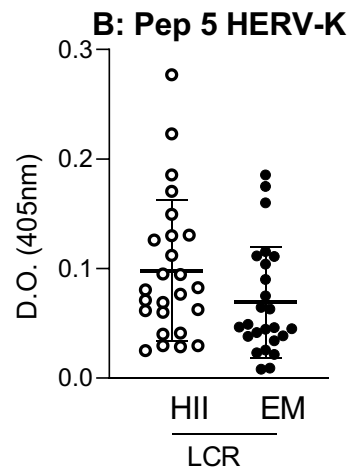


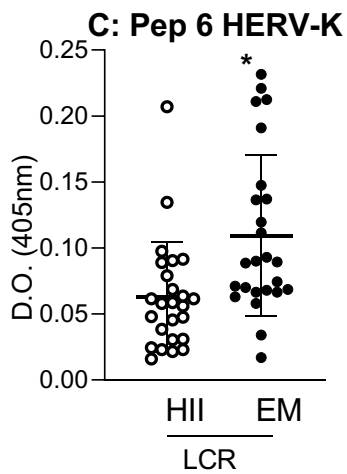
Figura 2. Comparação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) e pep 01 (B) (HERV-W) no LCR (Líquido cefalorraquidiano) do grupo controle (HII -pseudotumor ) e grupo da EM ( esclerose múltipla).



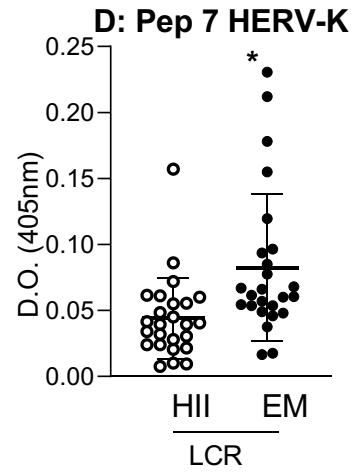
$p = 0,0574$



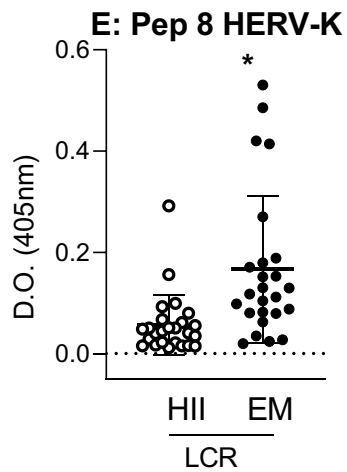
$p = 0,0816$



$p=0,0007$



$p=0,0009$



$p<0,0001$

Figura 3. Comparação dos peptídeos do HERV-K (Pep 02 (A) ,05 (B), 06 (C) ,07 (D) 08(E) , no LCR (líquido cefalorraquidiano) no grupo controle HII ( pseudotumor ) e no grupo EM ( Esclerose Múltipla).

Para determinar a resposta humoral no soro dos pacientes de Esclerose Múltipla (grupo EM) ao peptídeo antigênico HERVs famílias W (01) e K (02,05,06,07,08), e do MOG , foram utilizados como controle negativo : soros de doadores saudáveis de dois diferentes bancos de soros . O Elisa foi realizado utilizando 25 µl de peptídeos (20 µg/ml) de peptídeos para revestir os poços com diluição 1:500 do soro em PBS

Observa-se resposta humoral no soro dos pacientes de Esclerose Múltipla (grupo EM) ao peptídeo W ( $p < 0,0001$ ) à MOG ( $p = 0,0119$ ) , ao peptídeos da família K : 02 , 05 ,06 e 07 ( $p=0,0006$  ;  $p = 0,0100$  ;  $p =0,0086$  ;  $p < 0,0001$  ; respectivamente ) .Não houve resposta humoral ao peptídeo 08 da família K ( $p=0,1937$ ).Conforme a seguir :

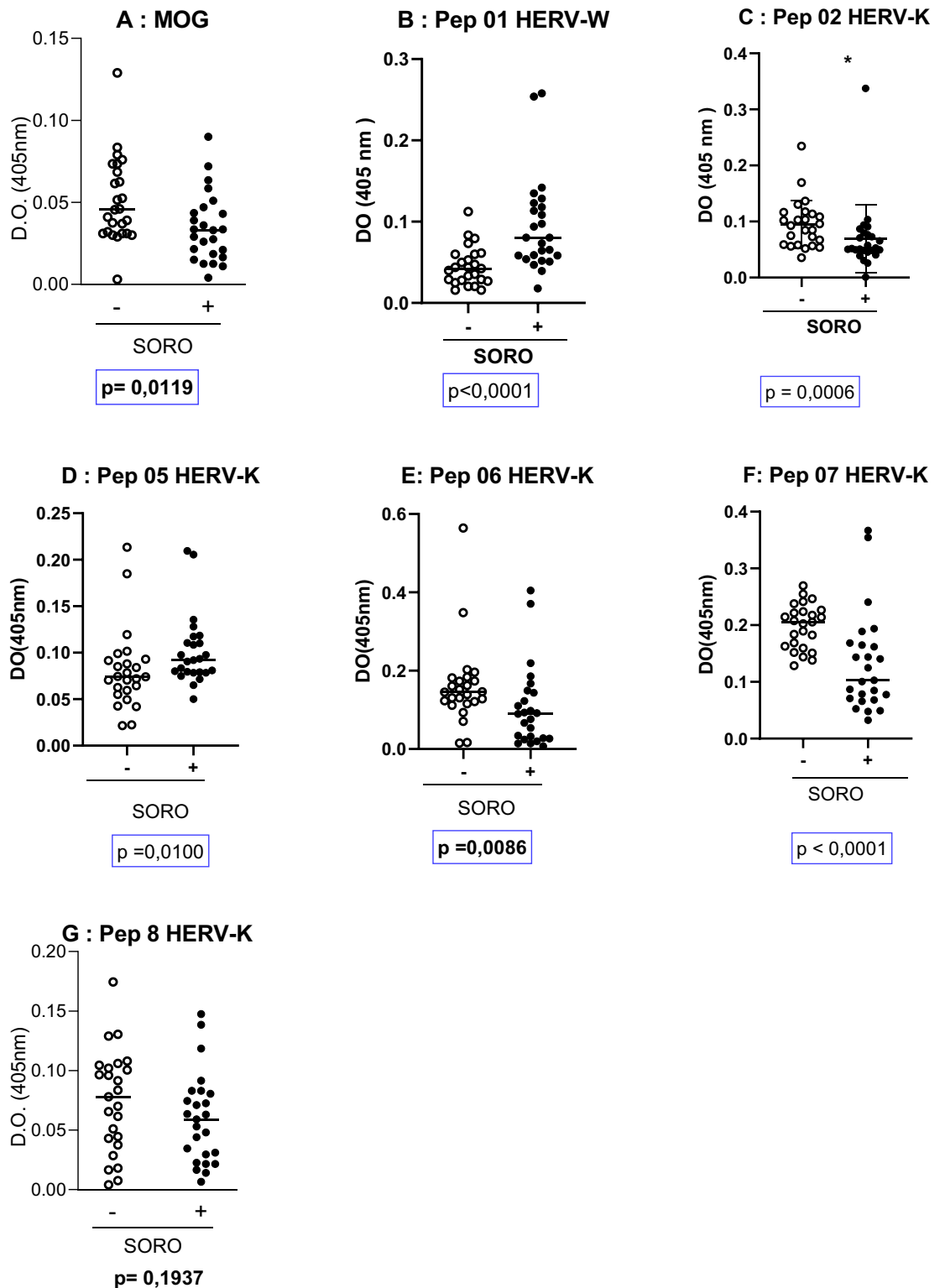
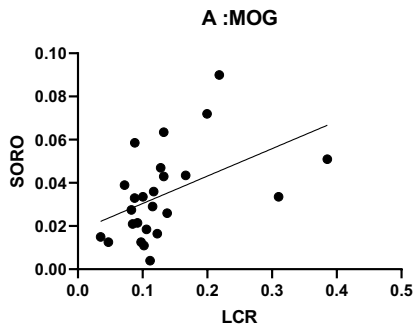


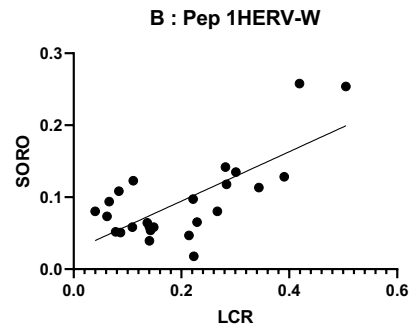
Figura 4. Comparação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) Pep 01 (B) (HERV-W) e os peptídeos da família K (02 (C),05 (D),06 (E),07(F),08 (G)) no soro dos pacientes de esclerose múltipla (grupo EM ,soro positivo) e soro negativo (grupos de doadores).

Para determinar a correlação da resposta humoral no LCR e soro dos pacientes com Esclerose Múltipla ao peptídeo antigênico HERVs famílias W (01) e K (02,05,06,07,08), e do MOG foram utilizados os LCRs do grupo da EM e o soro do grupo da EM. O Elisa foi realizado utilizando 25 µl de peptídeos (20 µg/ml) de peptídeos para revestir os poços com diluição 1:2 do LCR e 1:500 para o soro.

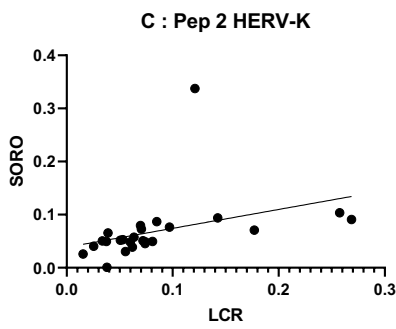
Observa-se correlação da resposta humoral anti MOG e HERV-W no LCR e soro dos pacientes com Esclerose Múltipla ( $p = 0,0170$  e  $r = 0,4728$  para MOG e  $p < 0,0001$  e  $r = 0,7240$  para HERV -W). Foi observado correlação à resposta humoral da família K nos peptídeos 05, 06 e 07 (para Pep05  $p = 0,0126$  e  $r = 0,4914$ , para Pep 06  $p = 0,0025$  e  $r = 0,5780$ , para Pep 07  $p = 0,0010$  e  $r = 0,6178$ ). Não foi observado correlação aos peptídeos 02, 08 (para Pep 02  $p = 0,0617$  e  $r = 0,3790$ , para Pep 08  $p = 0,3054$  e  $r = 0,2135$ ) A seguir:



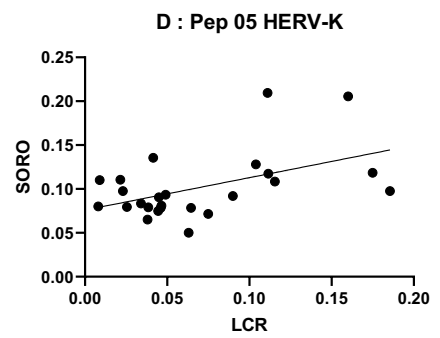
$p = 0,0170$   
 $r = 0,4728$



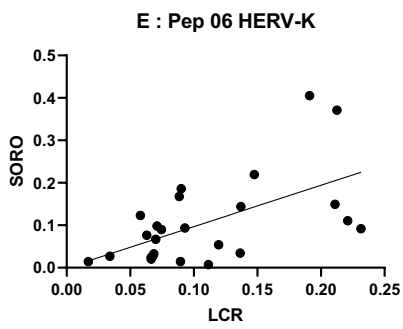
$p < 0,0001$   
 $r = 0,7240$



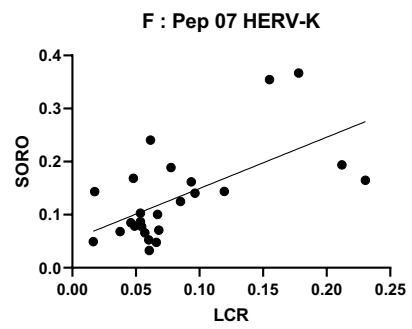
$p = 0,0617$   
 $r = 0,3790$



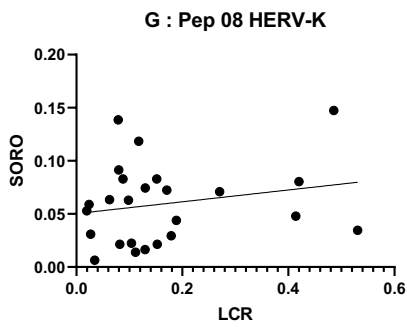
$p = 0,0126$   
 $r = 0,4914$



$p = 0,0025$   
 $r = 0,5780$



$p = 0,0010$   
 $r = 0,6178$



$p = 0,3054$   
 $r = 0,2135$

Figura 5. Correlação dos peptídeos MOG (A) (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos) Pep 01 (B) (HERV-W) e os peptídeos da família K (02, (C), 05 (D), 06 (E), 07 (F), 08 (G)) no LCR e soro dos pacientes de Esclerose Múltipla.

## 6.0 Discussão

Os resultados encontrados nos LCRs do grupo da Esclerose Múltipla, são características típicas da EM encontrados na literatura: contagem de leucócitos levemente elevado<sup>91</sup> predomínio de linfócitos<sup>92</sup>, Índice de IgG acima de 0,7 e BOCs tipo 2 e 3, que caracterizam a síntese intratecal das imunoglobulinas, sem quebra da barreira hematoencefálica<sup>93,94</sup>.

Os peptídeos usados nesse trabalho, foram utilizados num estudo anterior Flose, B. R.<sup>87</sup> sendo peptídeos do envelope HERV-W (env) e da polimerase HERV-K (pol) que possuem 50 % de similaridade com a MOG, mostram locais potenciais para a resposta autoimune, por um possível mecanismo de mimetismo molecular entre os HERVs e a MOG<sup>58,59,95</sup>.

Outros estudos usaram peptídeo relacionado ao HERV –W env, demonstrando a presença de anticorpo anti HERV–W no LCR e no soro de pacientes com esclerose múltipla, a maioria pela técnica de PCR<sup>96</sup>, como demonstrado no presente estudo a resposta anti-HERV-W no LCR de pacientes com EM ( $p=0,0142$ ) e no soro ( $p<0,0001$ ) pela técnica de ELISA, foi demonstrada em estudos anteriores<sup>97,98</sup>.

O estudo de Arru et al<sup>98</sup> demonstrou anticorpos anti HERV-K env no LCR e soro de pacientes com esclerose múltipla, descrevemos aqui peptídeos HERV-K pol com resposta humoral no LCR de pacientes da esclerose múltipla (peptídeos 06,07, 08 ( $p=0,0007$ ;  $p=0,0009$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente), no soro da EM (peptídeos 02, 05,06,07;  $p=0,0006$ ;  $p=0,0100$ ;  $p=0,0086$ ;  $p<0,0001$ , respectivamente), sendo o gene pol pouco investigado para doenças autoimunes, a maioria apresenta estudos anteriores com resposta humoral aos genes gag, env do HERV-K em diferentes populações de esclerose múltipla<sup>99,100</sup>.

Ainda nesse estudo de Arru et al<sup>98</sup>, foi demonstrado correlação HERV-W env positiva entre o LCR e soro dos pacientes com EM, como também demonstrado no presente estudo correlação do HERV-W no LCR e soro ( $p<0,0001$  e  $r=0,7240$ ).

Demostramos também correlação positiva entre LCR e soro dos pacientes com EM para : MOG ( $p=0,0170$  e  $r=0,4728$ ) , HERV-K pol (peptídeos 05:  $p=0,0126$   $r=0,4914$ ; peptídeo 6:  $p=0,0025$  e  $r=0,5780$ ; peptídeo 7:  $p=0,0010$  e  $r=0,6178$  ).

Em relação a resposta humoral do LCR de esclerose múltipla ao MOG ( $p<0,001$ ). Outros estudos já demostraram essa resposta de anticorpos anti-MOG no LCR de pacientes com esclerose múltipla utilizando o método de Elisa, indicando que foram sintetizados via intratecal, naqueles pacientes que apresentavam pela as BOC 77,101,102 .

No estudo de Jarius et al, que é o maior e mais abrangente em achados do LCR na EM, não identificou resposta do anti -MOG no LCR , devido à ausência das BOCs na suas amostras adultas e pediátricas <sup>103,104</sup>. Nesse estudo houve o viés das amostras serem congeladas , podendo ter perdido durante o descongelamento as BOCs .

O estudo de Reindi <sup>105</sup> e no de Sun <sup>106</sup> demonstrou-se que os anticorpos anti-MOG no LCR e no soro de pacientes com Esclerose Múltipla, como demonstrado no presente estudo LCR  $p<0,001$  e no soro  $p=0,0119$ . Descrevemos uma correlação positiva de anticorpos anti-MOG no soro e no LCR o que indica uma condição sistêmica de circulação, uma produção de anticorpos anti-MOG, o que pode sugerir que este teste poderia ser detectado com uma abordagem menos invasiva com relevância clínica.

Os peptídeos sintetizados possuem 50 % similaridade à MOG, demostramos correlação do Anti-MOG no soro dos pacientes com EM com Herv-W (pep01), no Herv-K( peptídeos 05,06,07) . Houve correlação do anti -MOG no LCR dos pacientes com EM com Herv -W (pep 01). Mostrando possíveis locais potenciais para a resposta autoimune, por meio de mimetismo molecular entre os HERV's e a MOG <sup>58,59,95</sup>.

O presente estudo apresenta a limitação de não conseguir avaliar qual tipo de EM o paciente apresenta, pois só temos os dados das bandas oligoclonais no momento do diagnóstico. É conhecido que independentemente da apresentação clínica distinta da EM a atividade transcricional do HERV-W é alta <sup>97</sup>.

Outra limitação não tínhamos o soro de pacientes com HII, não tinha indicação clínica para a coleta. Para avaliar à resposta humoral no soro, foi necessário utilizar como controle o banco de soro.

Os próximos estudos deverão centrar-se em estudar o nível de anti-HERV-W e K nos tipos de EM. Seleccionamos peptídeos restritos que não excluam outros locais potenciais semelhantes ao MOG que possam ser de interesse para desencadear resposta autoimune. Outros peptídeos devem ser considerado de outra forma para compreender de forma abrangente a dinâmica da resposta de anticorpos contra este vírus e talvez contra auto antígenos.

## **7.0 Conclusão**

Através do método de Elisa indireto demonstramos resposta humoral anti-HERV-W (env) e anti-MOG e anti-HERV-K (pol) no LCR e soro de pacientes com EM . Utilizamos peptídeos que foram sintetizados possuindo 50 % de similaridade com a MOG, que mostram locais potenciais para a resposta autoimune, por meio de mimetismo molecular entre os HERVs e a MOG.

No presente estudo trazemos resposta humoral anti-HERV-K para genes da pol (polimerase), gene pouco estudado nas doenças autoimune como à EM , não havendo publicações ate o momento .

Várias evidências apontam para o papel dos HERVs na patogênese da EM e os níveis de concentração de anticorpos anti-HERV-K, W e MOG no soro e no LCR se correlacionam positivamente, acredita-se que isso pode ser usado como um biomarcador para da doença da EM.

## 8. Referências Bibliográficas

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019 Jan 18;26(1):27–40.
2. Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. Vitamina D y remielinización en la esclerosis múltiple. *Neurología*. 2018 Apr;33(3):177–86.
3. Oskari Virtanen J, Jacobson S. Viruses and Multiple Sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2012 Jun 1;11(5):528–44.
4. Bar-Or A. Multiple sclerosis and related disorders: evolving pathophysiologic insights. *Lancet Neurol*. 2016 Jan;15(1):9–11.
5. Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol*. 2015 Apr;127–128:1–22.
6. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018 Feb;17(2):162–73.
7. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019 Jan 18;26(1):27–40.
8. Ruiz F, Vigne S, Pot C. Resolution of inflammation during multiple sclerosis. *Semin Immunopathol*. 2019 Nov 15;41(6):711–26.
9. Lo Sasso B, Agnello L, Bivona G, Bellia C, Ciaccio M. Cerebrospinal Fluid Analysis in Multiple Sclerosis Diagnosis: An Update. *Medicina (B Aires)*. 2019 Jun 4;55(6):245.
10. Yamout B, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2018 Apr 23;38(02):212–25.
11. Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol*. 2013 Dec 26;13(1):128.
12. da Gama Pereira ABCN, Sampaio Lacativa MC, da Costa Pereira FFC, Papais Alvarenga RM. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2015 Nov;4(6):572–9.
13. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):840–6.

14. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011 Feb 8;69(2):292–302.
15. Zhang K, Zhao Y, Liang Z, Wang C, Liu X. Validity of the McDonald criteria in predicting second events in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord*. 2020 Aug;43:102223.
16. Simonsen CS, Flemmen HØ, Lauritzen T, Berg-Hansen P, Moen SM, Celius EG. The diagnostic value of IgG index versus oligoclonal bands in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2020 Jan 22;6(1):205521731990129.
17. Makhani N, Lebrun C, Siva A, Narula S, Wassmer E, Brassat D, et al. Oligoclonal bands increase the specificity of MRI criteria to predict multiple sclerosis in children with radiologically isolated syndrome. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2019 Jan 20;5(1):205521731983666.
18. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2005 Jun 1;62(6).
19. Virtanen J, Wohler J, Fenton K, Reich D, Jacobson S. Oligoclonal bands in multiple sclerosis reactive against two herpesviruses and association with magnetic resonance imaging findings. *Multiple Sclerosis Journal*. 2014 Jan 30;20(1):27–34.
20. Frederiksen JL, Sindic CJ. Intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG, and of free kappa and free lambda oligoclonal bands in acute monosymptomatic optic neuritis. Comparison with brain MRI. *Multiple Sclerosis Journal*. 1998 Feb 2;4(1):22–6.
21. Ferraro D, Galli V, Simone AM, Bedin R, Vitetta F, Merelli E, et al. Cerebrospinal fluid anti-Epstein-Barr virus specific oligoclonal IgM and IgG bands in patients with clinically isolated and Guillain-Barré syndrome. *J Neurovirol*. 2017 Apr 22;23(2):329–34.
22. Kamińska J, Koper OM, Piechal K, Kemonia H. Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential. *Postepy Hig Med Dosw*. 2017 Jun 30;71(1):0–0.
23. Nora-Krukle Z, Chapenko S, Logina I, Millers A, Platkajis A, Murovska M. Human herpesvirus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis. *Medicina (Kaunas)*. 2011;47(10):527–31.
24. Pfuhl C, Oechtering J, Rasche L, Gieß RM, Behrens JR, Wakonig K, et al. Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2015 Aug;285:156–60.
25. Perron H, Garson JA, Bedin F, Beseme F, Paranhos-Baccala G, Komurian-Pradel F, et al. Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated

- from patients with multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997 Jul 8;94(14):7583–8.
26. Houen G, Heiden J, Trier NH, Draborg AH, Benros ME, Zinkevičiūtė R, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus and neurotropic viruses in multiple sclerosis and optic neuritis. *J Neuroimmunol*. 2020 Sep;346:577314.
  27. Ruprecht K, Wildemann B, Jarius S. Low intrathecal antibody production despite high seroprevalence of Epstein–Barr virus in multiple sclerosis: a review of the literature. *J Neurol*. 2018 Feb 2;265(2):239–52.
  28. Leibovitch EC, Jacobson S. Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update. *Curr Opin Virol*. 2014 Dec;9:127–33.
  29. Ortega-Madueño I, Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo MI, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, et al. Anti-Human Herpesvirus 6A/B IgG Correlates with Relapses and Progression in Multiple Sclerosis. *PLoS One*. 2014 Aug 11;9(8):e104836.
  30. Goodman AD, Mock DJ, Powers JM, Baker JV, Blumberg BM. Human Herpesvirus 6 Genome and Antigen in Acute Multiple Sclerosis Lesions. *J Infect Dis*. 2003 May;187(9):1365–76.
  31. Weiss RA. The discovery of endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2006 Dec 3;3(1):67.
  32. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome. *Science (1979)*. 2001 Feb 16;291(5507):1304–51.
  33. Belshaw R, Pereira V, Katzourakis A, Talbot G, Pačes J, Burt A, et al. Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004 Apr 6;101(14):4894–9.
  34. Shih A, Coutavas EE, Rush MG. Evolutionary implications of primate endogenous retroviruses. *Virology*. 1991 Jun;182(2):495–502.
  35. Patience C. Our retroviral heritage. *Trends in Genetics*. 1997 Mar;13(3):116–20.
  36. David M. Knipe PMH. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
  37. Li F, Nellåker C, Yolken RH, Karlsson H. A systematic evaluation of expression of HERV-W elements; influence of genomic context, viral structure and orientation. *BMC Genomics*. 2011 Dec 12;12(1):22.
  38. Kovalskaya E, Buzdin A, Gogvadze E, Vinogradova T, Sverdlov E. Functional human endogenous retroviral LTR transcription start sites are located between the R and U5 regions. *Virology*. 2006 Mar;346(2):373–8.

39. Dolei A. Endogenous retroviruses and human disease. *Expert Rev Clin Immunol.* 2006 Jan 10;2(1):149–67.
40. Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriquand C, Pellat J, Perret J, et al. Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Res Virol.* 1989 Jan;140:551–61.
41. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long Terminal Repeats Are Used as Alternative Promoters for the Endothelin B Receptor and Apolipoprotein C-I Genes in Humans. *Journal of Biological Chemistry.* 2001 Jan;276(3):1896–903.
42. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, Samuelson LC, Meisler MH. Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev.* 1992 Aug;6(8):1457–65.
43. Mi S, Lee X, Li X ping, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature.* 2000 Feb;403(6771):785–9.
44. Garson J, Tuke P, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H. Detection of virion-associated MSR-V-RNA in serum of patients with multiple sclerosis. *The Lancet.* 1998 Jan;351(9095):33.
45. Dolei A, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Sechi G, Cirotto MC, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients. *Neurology.* 2002 Feb 12;58(3):471–3.
46. Nowak J, Januszkiewicz D, Pernak M, Liweń I, Zawada M, Rembowska J, et al. Multiple Sclerosis-Associated Virus-Related pol Sequences Found Both in Multiple Sclerosis and Healthy Donors are More Frequently Expressed in Multiple Sclerosis Patients. *J Neurovirol.* 2003 Jan;9(1):112–7.
47. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A. Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia. *Neurological Sciences.* 2001 Apr 1;22(2):171–3.
48. Sotgiu S, Serra C, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Arru G, et al. Multiple sclerosis-associated retrovirus and MS prognosis: An observational study. *Neurology.* 2002 Oct 8;59(7):1071–3.
49. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN. The Envelope Protein of a Human Endogenous Retrovirus-W Family Activates Innate Immunity through CD14/TLR4 and Promotes Th1-Like Responses. *The Journal of Immunology.* 2006 Jun 15;176(12):7636–44.
50. Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, et al. Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci.* 2004 Oct 26;7(10):1088–95.

51. Tarlinton RE, Martynova E, Rizvanov AA, Khaiboullina S, Verma S. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses*. 2020 Jun 13;12(6):643.
52. Grandi N, Tramontano E. HERV Envelope Proteins: Physiological Role and Pathogenic Potential in Cancer and Autoimmunity. *Front Microbiol*. 2018 Mar 14;9.
53. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, et al. Multiple Sclerosis Retrovirus Particles and Recombinant Envelope Trigger an Abnormal Immune Response in Vitro, by Inducing Polyclonal V $\beta$ 16 T-Lymphocyte Activation. *Virology*. 2001 Sep;287(2):321–32.
54. Morandi E, Tarlinton RE, Tanasescu R, Gran B. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Causation, association, or after-effect? *Multiple Sclerosis Journal*. 2017 Jul 13;23(8):1050–5.
55. Ogasawara H, Kageyama M, Yamaji K, Takasaki Y. The possibility that autoimmune disease can be induced by a molecular mimicry mechanism between autoantigen and human endogenous retrovirus. *Lupus*. 2010 Jan 2;19(1):111–3.
56. Geginat J, Paroni M, Pagani M, Galimberti D, De Francesco R, Scarpini E, et al. The Enigmatic Role of Viruses in Multiple Sclerosis: Molecular Mimicry or Disturbed Immune Surveillance? *Trends Immunol*. 2017 Jul;38(7):498–512.
57. Mameli G, Cossu D, Cocco E, Frau J, Marrosu MG, Niegowska M, et al. Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2015 Mar;280:66–8.
58. do Olival GS, Faria TS, Nali LHS, de Oliveira ACP, Casseb J, Vidal JE, et al. Genomic analysis of ERVWE2 locus in patients with multiple sclerosis: absence of genetic association but potential role of human endogenous retrovirus type W elements in molecular mimicry with myelin antigen. *Front Microbiol*. 2013;4.
59. Ramasamy R, Joseph B, Whittall T. Potential molecular mimicry between the human endogenous retrovirus W family envelope proteins and myelin proteins in multiple sclerosis. *Immunol Lett*. 2017 Mar;183:79–85.
60. Belshaw R, Dawson ALA, Woolven-Allen J, Redding J, Burt A, Tristem M. Genomewide Screening Reveals High Levels of Insertional Polymorphism in the Human Endogenous Retrovirus Family HERV-K(HML2): Implications for Present-Day Activity. *J Virol*. 2005 Oct;79(19):12507–14.
61. Subramanian RP, Wildschutte JH, Russo C, Coffin JM. Identification, characterization, and comparative genomic distribution of the HERV-K (HML-2) group of human endogenous retroviruses. *Retrovirology*. 2011 Dec 8;8(1):90.

62. Douville R, Liu J, Rothstein J, Nath A. Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2011 Jan;69(1):141–51.
63. Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, Ali HA, Veitch A, Rylance PB, et al. A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol*. 2010 May 7;160(3):340–7.
64. Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol*. 2005 May;15(3):179–211.
65. Antony JM, Zhu Y, Izad M, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F, et al. Comparative Expression of Human Endogenous Retrovirus-W Genes in Multiple Sclerosis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Oct;23(10):1251–6.
66. Tai A, O'Reilly E, Alroy K, Simon K, Munger K, Huber B, et al. Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2008 Nov 13;14(9):1175–80.
67. Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, Arcari R, Schüpbach J, Mach B. A Human Endogenous Retroviral Superantigen as Candidate Autoimmune Gene in Type I Diabetes. *Cell*. 1997 Jul;90(2):303–13.
68. Moyes DL, Goris A, Ban M, Compston A, Griffiths DJ, Sawcer S, et al. HERV-K113 Is Not Associated with Multiple Sclerosis in a Large Family-Based Study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Mar;24(3):363–5.
69. Antony JM, DesLauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C. Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: Innocent bystanders or disease determinants? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2011 Feb;1812(2):162–76.
70. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*. 2001 Sep;2(9):762–4.
71. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000 Jun;47(6):707–17.
72. Martin R, McFarland HF, McFarlin DE. Immunological Aspects of Demyelinating Diseases. *Annu Rev Immunol*. 1992 Apr;10(1):153–87.
73. Dubois-Dalcq M, Armstrong R. The cellular and molecular events of central nervous system remyelination. *BioEssays*. 1990 Dec;12(12):569–76.
74. Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Canella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, et al. Visualization of Myelin Basic Protein (Mbp) T Cell Epitopes in Multiple Sclerosis Lesions Using a Monoclonal Antibody Specific for the Human Histocompatibility Leukocyte Antigen (Hla)-Dr2–Mbp 85–99 Complex. *Journal of Experimental Medicine*. 2000 Apr 17;191(8):1395–412.

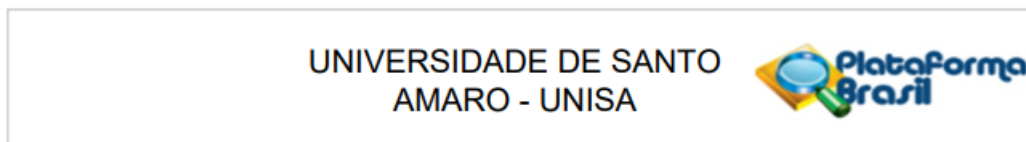
75. Kerlero de Rosbo N, Milo R, Lees MB, Burger D, Bernard CC, Ben-Nun A. Reactivity to myelin antigens in multiple sclerosis. Peripheral blood lymphocytes respond predominantly to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Journal of Clinical Investigation*. 1993 Dec 1;92(6):2602–8.
76. Būdinger HC Von, Tanuma N, Villoslada P, Ouallet JC, Hauser SL, Genain CP. Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination. *J Clin Immunol*. 2001;21(3):155–70.
77. Xiao BG, Linington C, Link H. Antibodies to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in cerebrospinal fluid from patients with multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol*. 1991 Feb;31(2):91–6.
78. Linington C, Lassmann H. Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol*. 1987 Dec;17(1):61–9.
79. Ikeda K, Kiyota N, Kuroda H, Sato DK, Nishiyama S, Takahashi T, et al. Severe demyelination but no astrocytopathy in clinically definite neuromyelitis optica with anti-myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibody. *Multiple Sclerosis Journal*. 2015 Apr 25;21(5):656–9.
80. Kaneko K, Sato DK, Nakashima I, Nishiyama S, Tanaka S, Marignier R, et al. Myelin injury without astrocytopathy in neuroinflammatory disorders with MOG antibodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016 Nov;87(11):1257–9.
81. Flach AC, Litke T, Strauss J, Haberl M, Gómez CC, Reindl M, et al. Autoantibody-boosted T-cell reactivation in the target organ triggers manifestation of autoimmune CNS disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016 Mar 22;113(12):3323–8.
82. McGeeney BE, Friedman DI. Pseudotumor Cerebri Pathophysiology. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*. 2014 Mar;54(3):445–58.
83. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Aug 1;57(8):897–902.
84. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*. 2005 Jun 1;62(6).
85. LIM M. A glimpse at the cerebrospinal fluid immunoglobulins in neurological conditions. Does it help the clinician? *Dev Med Child Neurol*. 2013 Jan;55(1):10–2.
86. Reiber H. Knowledge-base for interpretation of cerebrospinal fluid data patterns. *Essentials in neurology and psychiatry. Arq Neuropsiquiatr*. 2016 Jun;74(6):501–12.

87. Flose BR. Perfil de expressão de retrovírus endógenos humanos e resposta humoral anti Herv-K e W em pacientes com Artrite Reumatoide . 2023.
88. Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, Ali HA, Veitch A, Rylance PB, et al. A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol*. 2010 May 7;160(3):340–7.
89. Hirata IY, Sedenho Cezari MH, Nakaie CR, Boschcov P, Ito AS, Juliano MA, et al. Internally quenched fluorogenic protease substrates: Solid-phase synthesis and fluorescence spectroscopy of peptides containing ortho-aminobenzoyl/dinitrophenyl groups as donor-acceptor pairs. *Letters in Peptide Science*. 1995 May;1(6):299–308.
90. Korkmaz B, Attucci S, Juliano MA, Kalupov T, Jourdan ML, Juliano L, et al. Measuring elastase, proteinase 3 and cathepsin G activities at the surface of human neutrophils with fluorescence resonance energy transfer substrates. *Nat Protoc*. 2008 Jun 15;3(6):991–1000.
91. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, Bernardi G, Cogato I, Fredman P, Frederiksen J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Aug 1;57(8):897–902.
92. Polman CH, de Groot CJA, Koetsier JC, Sminia T, Veerman AJP. Cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis and other neurological diseases: an immunocytochemical study. *J Neurol*. 1987 Jan;234(1):19–22.
93. Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol*. 2005 Jul;12(7):527–30.
94. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019 Apr 12;10.
95. Rangel SC, da Silva MD, da Silva AL, dos Santos J de MB, Neves LM, Pedrosa A, et al. Human endogenous retroviruses and the inflammatory response: A vicious circle associated with health and illness. *Front Immunol*. 2022 Nov 23;13.
96. Morandi E, Tanasescu R, Tarlinton RE, Constantinescu CS, Zhang W, Tench C, et al. The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017 Feb 16;12(2):e0172415.
97. Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Multiple Sclerosis Journal*. 2012 Dec 28;18(12):1721–36.
98. Arru G, Sechi E, Mariotto S, Farinazzo A, Mancinelli C, Alberti D, et al. Antibody response against HERV-W env surface peptides differentiates

- multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler J Exp Transl Clin*. 2017 Dec 22;3(4):205521731774242.
99. Arru G, Galleri G, Deiana GA, Zarbo IR, Sechi E, Bo M, et al. HERV-K Modulates the Immune Response in ALS Patients. *Microorganisms*. 2021 Aug 23;9(8):1784.
  100. Arru G, Mameli G, Deiana GA, Rassu AL, Piredda R, Sechi E, et al. Humoral immunity response to human endogenous retroviruses K/W differentiates between amyotrophic lateral sclerosis and other neurological diseases. *Eur J Neurol*. 2018 Aug 14;25(8):1076.
  101. Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier M V, Linington C. Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol*. 1999 Jun;97(1–2):9–15.
  102. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain*. 1999 Nov;122(11):2047–56.
  103. Jarius S, Pellkofer H, Siebert N, Korporal-Kuhnke M, Hümmert MW, Ringelstein M, et al. Cerebrospinal fluid findings in patients with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies. Part 1: Results from 163 lumbar punctures in 100 adult patients. *J Neuroinflammation*. 2020 Dec 3;17(1):261.
  104. Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, Borisow N, Asgari N, Pitarokoili K, et al. MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 2: Epidemiology, clinical presentation, radiological and laboratory features, treatment responses, and long-term outcome. *J Neuroinflammation*. 2016 Dec 28;13(1):280.
  105. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain*. 1999 Nov;122(11):2047–56.
  106. Sun J, Link H, Olsson T, Xiao BG, Andersson G, Ekre HP, et al. T and B cell responses to myelin-oligodendrocyte glycoprotein in multiple sclerosis. *J Immunol*. 1991 Mar 1;146(5):1490–5.

## ANEXOS

### Anexo 1- Aprovação do comitê de ética da Universidade Santo Amaro (UNISA)



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise da resposta humoral anti-MOG e anti-HERV em amostras em líquido cefalorraquidiano e soro de pacientes com Esclerose Múltipla

**Pesquisador:** KARIN CRISTINA GARCIA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 60591622.9.0000.0081

**Instituição Proponente:** OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.572.749

##### Apresentação do Projeto:

- A proposta de pesquisa foi analisar a frequência de anticorpos anti-MOG e anti-HERV em as amostras de liquor e soro de pacientes com Esclerose Múltipla.

##### Objetivo da Pesquisa:

- Analisar a frequência de anticorpos anti-MOG e anti-HERV em as amostras de liquor e soro de pacientes com Esclerose Múltipla.