



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

Laboratório de Imunogenética

TESE DE DOUTORADO

**Imunogenética da esclerose múltipla – o papel dos genes
CCR5 e *GSTT1***

Aluno de doutorado: Lian Lopes Troncoso

Orientador: Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Porto Alegre

Outubro de 2018

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LIAN LOPES TRONCOSO

**Imunogenética da esclerose múltipla – o papel dos genes
CCR5 e *GSTT1***

Prof. Dr. José Artur Bogo Chies

Orientador

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Porto Alegre

Outubro de 2018

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

INSTITUIÇÃO DE ORIGEM

- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

INSTITUIÇÕES COLABORADORAS

- Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)
- Universidade de São Paulo (USP)

AGÊNCIA FINANCIADORA

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, **Professor Dr. José Artur Bogo Chies**, por me aceitar na equipe me mostrar o caminho correto a seguir, de forma única, admirável e exemplar. Muito obrigado pela confiança e por contribuir com minha formação, e por todo respeito com que sempre abordou em nossas reuniões, mesmo quando as coisas não iam bem. Admiro seu trabalho e sua capacidade de explicar com clareza. Obrigado por todo conhecimento e ética que me transmitiu. Espero que nossas conversas tenham continuidade.

À Professora **Dra. Alessandra Pontillo**, da Universidade Federal de São Paulo (USP), pela importante colaboração com nosso laboratório, seus direcionamentos foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Muito obrigado por toda ajuda.

Ao **Dr. Alessandro Finkelsztejn**, do departamento de neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por apoiar o projeto e aceitar colaborar com este trabalho. Obrigado pelas reuniões que, de uma forma ou de outra, sempre deram resultados práticos importantes.

Muito obrigado também à **Silvete Schneider**, também do departamento de neurologia do HCPA, pela boa vontade e colaboração de extrema importância com este trabalho.

Ao **PPGBM**, especialmente ao **Elmo**, que ajudou muito com a organização dos créditos e as regras da pós. Agradeço também à **CAPES** pelo incentivo financeiro.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunogenética, quero agradecer-lhes os momentos magníficos, que passamos. Agradeço o bom convívio, as boas discussões e, a alegria. Agradeço especialmente: **Dine, Maria, Rafael, Jacque, Fran, Gio, Gustavo, Tiago e Ana**, que me receberam de forma muito carinhosa na equipe. Me ensinaram muito sobre imunologia e genética, mas também sobre os gaúchos e a vida em Porto Alegre. Agradeço também ao **Joel** e à **Valéria** pelos conselhos, amizade e companheirismo.

Aos alunos de mestrado **Cesar e Júlio** e aos alunos de iniciação científica **Bruno e Bruna** pelo ótimo convívio conversas.

Foi uma honra ter a oportunidade de conhece-los e trabalhar ao lado de todos vocês!

Agradeço muito aos meus grandes amigos **Bruno Morani, Marco Antero e Victor Lopes**, que não há distância capaz de diminuir nossa amizade. São os únicos que conseguem me fazer rir nos momentos mais difíceis. Obrigado pelo incentivo e compreensão de vocês durante meu doutorado.

À **Priscila Hernandes**, com amor, por todo incentivo, carinho e paciência. Muito obrigado pela preocupação e apoio demonstrados nos últimos anos, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, **Luciano e Simone**, e ao meu irmão, **Leandro**, que me apoiam sempre. Simplesmente devo tudo a vocês! Muito obrigado com todo meu amor.

A todos vocês os meus sinceros agradecimentos!

Dedico este trabalho aos meus pais, Luciano e Simone, com todo amor e gratidão, por tudo que fizeram por mim ao longo de minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
CAPÍTULO 1–INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Esclerose Múltipla (EM).....	16
1.2 Epidemiologia.....	19
1.3 Etiologia.....	21
1.4 Sistema Imunológico e a EM.....	25
1.5 Quimiocina e Receptores na EM.....	30
1.6 CCR5 na EM.....	32
1.7 Enzimas metabólicas.....	34
1.8 A superfamília das GSTs.....	35
1.9 As GSTs na EM.....	37
CAPÍTULO 2 -OBJETIVOS.....	39
CAPÍTULO 3 – ARTIGO 1.....	41
CCR5 Δ 32 – a piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility.....	41
CAPÍTULO 4 – ARTIGO 2.....	68
The glutathione S-transferase T1 deletion in multiple sclerosis patients from Brazil.....	68
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÕES COMPLEMENTARES.....	85
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXO I.....	108
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES.....	108
ANEXO II.....	110

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE.....	110
ANEXO III	112
QUESTIONÁRIO	112
ANEXO IV	114
DIVULGAÇÃO	114

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – Célula apresentadora de antígeno

bp – Pares de bases

CCL - Ligante de quimiocina C-C

CCR - Receptor de quimiocina C-C

CD – Grupo de diferenciação

CYP - Citocromo P450

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EAE - Encefalomielite Experimental Autoimune

ECG – Eletroencefalograma

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EM – Esclerose múltipla

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

ERO - Espécies reativas de oxigênio

GDP - Guanosina difosfato

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

GST – Glutathione S-Transferase

GTP - Guanosina trifosfato

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA – Antígeno leucocitário humano

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

kDa – kilo Dalton

LFA - Antígeno de função associada a linfócito

MCAM – Molécula de adesão celular de melanoma

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MMP – Matriz metaloproteinase

NK - *Natural killer*

RR – Remitente Recorrente

SNC – Sistema nervoso central

SP – Secundária Progressiva

STAT3 – Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

T CD4 – Linfócito CD4

T CD8 – Linfócito CD8

TGF- β – Fator de crescimento tumoral beta

Th – Célula T *helper*

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFRSF1A – Receptor de fator de necrose tumoral

Treg – Célula T regulatória

TYK2 - Tirosina quinase 2

UVB - Ultravioleta B

VLA – Antígeno muito tardio

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da prevalência global da esclerose múltipla -----	20
Figura 2. Distribuição da radiação UVB pelo mundo -----	23
Figura 3. Imunopatogênese na fase RR(I) e progressiva (II) da EM -----	29
Figura 4. Quimiocina e seus receptores-----	31
Figura 5. Visão geral da biotransformação enzimática de xenobióticos-----	36

RESUMO

A esclerose múltipla é uma doença inflamatória multifatorial que afeta o sistema nervoso central. Sua patogênese não é completamente compreendida, mas os aspectos principais da doença são a inflamação e a neurodegeneração, os danos causados pela resposta imunológica contra componentes da bainha de mielina causam déficit na propriedade de condução dos impulsos nervosos pelos axônios. A forma remitente recorrente é configurada por ataques agudos seguidos de recuperação completa ou incompleta dos indivíduos após um curto período de tempo, enquanto a forma progressiva é definida pela progressão dos sintomas e declínio gradual das funções neurais, geralmente envolvendo as mesmas áreas do SNC que eram afetadas na fase recorrente da doença. Diversos fatores têm sido relacionados ao desenvolvimento e à distribuição geográfica da EM no mundo como radiação ultravioleta, aspectos socioculturais e demográficos, estilo de vida e hábitos pessoais. A inflamação durante a EM afeta apenas o SNC, sugerindo fortemente que células T e B são recrutadas seletivamente para resposta direcionada a um antígeno específico expresso somente no SNC. A produção de citocinas inflamatórias por essas células promove a exacerbação da inflamação, recrutando novas células que atravessam a barreira hematoencefálica com a participação de quimiocinas. Populações de células Th1 no líquido cefalorraquidiano expressam amplamente CCR5 em suas membranas. Além disso, CCR5 também é altamente expresso em macrófagos/micróglia, células T CD8 e monócitos presentes no sítio da inflamação na EM. Como a perda de função desse receptor está potencialmente associada com a redução da infiltração de linfócitos no SNC, este trabalho teve como alvo avaliar os possíveis papéis do CCR5 no desenvolvimento da esclerose múltipla, analisando aspectos genéticos e clínicos nos pacientes para comparar com grupo controle (estudo caso/controle). Para isso, 261 pacientes e 435 indivíduos saudáveis foram genotipados para *CCR5Δ32*. As frequências alélicas e genotípicas dos pacientes foram comparadas com as dos controles, e entre os pacientes de acordo com a forma clínica e a severidade da doença (através do EDSS e MSSS). Nossos resultados indicaram que a deleção *CCR5Δ32* contribui como um fator de proteção contra o desenvolvimento e progressão da esclerose múltipla em Euro-descendentes no Brasil. Além disso, as respostas inflamatórias elevam a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos ativados e micróglia, que

produzem aos neurônios e contribuem para a sinaptopatia e atrofia neuronal. Além disso, o estresse oxidativo está relacionado à perda da integridade da barreira hematoencefálica e invasão dos linfócitos ao SNC. As Glutathionas S-Transferases são enzimas detoxificantes de fase II que possuem múltiplos papéis biológicos, sendo necessárias para a proteção das células contra estresse oxidativo. Portanto, este trabalho também avaliou os possíveis papéis da Glutathionas S-Transferase T1 no desenvolvimento da esclerose múltipla, para isso, foram genotipados 246 pacientes e 328 indivíduos saudáveis para deleção do alelo *GSTT1* e os dados foram comparados (estudo caso/controle). Além disso, a deleção foi analisada em relação à severidade e progressão da doença. Nossos dados não indicaram relação entre a deleção do alelo com risco à esclerose múltipla e com a severidade da doença.

ABSTRACT

Multiple sclerosis is a multifactorial inflammatory disease that affects the central nervous system. Its pathogenesis is not fully understood, but the main aspects are inflammation and neurodegeneration, the damage caused by the immune response against the myelin sheath causes a deficit in the conduction property of the nerve impulses by the axons. The recurrent remitting form of disease is configured as acute attacks followed by complete or partial recovery of individuals after a short period, while the progressive form is defined as the progression of symptoms and gradual decline of neural functions, usually involving the same areas of the CNS that were affected in the recurrent phase of the disease. Several factors have been related to the development and geographical distribution of MS in the world as ultraviolet radiation, sociocultural and demographic aspects, lifestyle and personal habits. Inflammation during MS affects only the CNS, strongly suggesting that T and B cells are selectively recruited for targeted response to a specific antigen expressed only in the CNS. The production of inflammatory cytokines by these cells promotes inflammatory exacerbation by recruiting other cells that cross the blood-brain barrier through migration mediated by chemokines. Th1 cell populations in cerebrospinal fluid extensively express CCR5 in their membranes. In addition, CCR5 is highly expressed in macrophages/microglia, CD8 T cells and monocytes present at the inflammation site during MS. As the loss of function of this chemokine receptor is potentially associated with reduced lymphocyte infiltration in the CNS, this study aimed to assess the possible role of CCR5 in the development of multiple sclerosis, analyzing genetic and clinical aspects in patients to compare with control group (case / control study), 261 patients and 435 healthy individuals were genotyped for *CCR5Δ32*. The patients allelic and genotype frequencies were compared with those of the control group, and among patients according to the clinical form and severity of the disease (through EDSS and MSSS). Our results indicated that deletion *CCR5Δ32* contributes as a protective factor against the development and progression of multiple sclerosis in European-derived from Brazil. In addition, inflammatory responses increase reactive oxygen and nitrogen species production by activated macrophages and microglia, which produce the neurons and contribute to synaptopathy and neuronal atrophy. In addition, oxidative stress is related to integrity loss of blood-brain barrier and invasion of

lymphocytes to the CNS. Glutathione S-Transferases are phase II detoxifying enzymes that have multiple biological roles and are necessary for the protection of cells against oxidative stress. Therefore, this study also assessed the possible roles of Glutathione S-Transferase T1 in the development of multiple sclerosis. 246 patients and 328 healthy individuals were genotyped for deletion of the *GSTT1* allele and data were compared (case-control study). In addition, the deletion was analyzed in relation to the disease severity and progression. Our data did not indicate any relation between the deletion of the *GSTT1* with risk of multiple sclerosis and the severity of the disease.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose Múltipla

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória multifatorial que afeta o sistema nervoso central (SNC) considerada resultante de fatores genéticos e ambientais ainda parcialmente conhecidos. (Belbasis *et al.*, 2015; Bettencourt *et al.*, 2012; Sawcer *et al.*, 2014) Sua patogênese não é completamente compreendida, mas os aspectos principais da doença são a inflamação e a neurodegeneração, os danos causados pela resposta imunológica contra componentes da mielina na bainha de mielina causam déficit na propriedade de condução dos impulsos nervosos pelos axônios. Como resultado desta resposta ocorre o surgimento de sintomas que se assemelham aos de um trauma cerebral (Kandelet *et al.*, 2000). As lesões ocorrem principalmente na substância branca, podendo também aparecer na cinzenta (Compston e Coles, 2008). Entende-se que os sintomas variam de acordo com o local das lesões e função dos nervos atingidos (Compston e Coles, 2008).

O diagnóstico é dificultado por essa variedade nos sintomas e os principais aspectos observados são: 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.

A maior parte dos pacientes com esclerose múltipla apresenta a forma remitente recorrente (RR) da doença, que é atualmente configurada por ataques agudos seguidos de recuperação completa ou incompleta dos indivíduos após um curto período de tempo. O ataque é definido pelo Painel Internacional de Diagnósticos da Esclerose Múltipla como sintomas ou sinais típicos de inflamação aguda no SNC, com a duração de pelo menos 24 horas, descartando a presença de infecção e febre. Em média os sintomas retornam 1,5 vezes por ano em pacientes com essa forma (Compston e Coles, 2008). Após essa fase moderada da doença, dois terços dos pacientes com esclerose múltipla RR avançam para uma fase secundária progressiva (SP) (Aktas *et al.*, 2010; Rovaris *et al.*, 2006) definida

pela progressão dos sintomas e declínio gradual das funções neurais, geralmente envolvendo as mesmas áreas do SNC que eram afetadas na fase recorrente da doença. O ponto de transição entre a fase recorrente e fase secundária progressiva é de difícil definição, sendo normalmente identificado de forma retrospectiva algum tempo após sua aparição. Em contrapartida, a forma primária progressiva da esclerose múltipla é caracterizada pelo déficit nas funções neurais desde o início da doença (Rovaris *et al.*, 2006; Sand, 2014).

Os critérios para o diagnóstico da EM vêm sendo modificados de acordo com o desenvolvimento de novas pesquisas e com a incorporação de tecnologias, como a utilização da ressonância magnética (Montalban *et al.*, 2010; Rovira *et al.*, 2009; Swanton *et al.*, 2007; Tur *et al.*, 2008). Atualmente, os critérios de McDonald 2010 são considerados os mais capazes de diagnosticar a esclerose múltipla, sendo considerada a apresentação clínica do paciente acompanhada de ressonância magnética mostrando duas ou mais lesões. Além disso, o diagnóstico é feito pela exclusão de outros distúrbios que tenham características clínicas semelhantes às da EM. Nesse caso, lesões na substância branca periventricular e lesões centro-semiovais e no corpo caloso são consideradas como características 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 aos portadores de outras formas clínicas (Vazquez-Marrufo *et al.*, 2008).

O diagnóstico da EM também pode ser auxiliado pelo exame de potenciais evocados de forma visual, auditiva e somatossensorial, úteis para detectar lesões silenciosas de desmielinização (García e Salavierri, 2006). No entanto, tais testes são úteis apenas quando se buscam lesões subclínicas no SNC de indivíduos suspeitos de EM (Minguetti, 2001).

1.2 Epidemiologia

A esclerose múltipla é considerada uma das mais intrigantes doenças neurológicas em virtude de seu caráter autoimune, crônico, sua frequência e tendência em acometer adultos jovens (de 20 a 40 anos) (Chemaly *et al.*, 2000; Ramagopalan *et al.*, 2009). Além disso, afeta predominantemente indivíduos do sexo feminino, numa proporção de 2:1 na maioria dos estudos (Honan *et al.*, 1978; Anderson e Gookin, 1996; Chemaly *et al.*, 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). Sua prevalência é bastante variável, percebendo-se que as maiores prevalências são localizadas em regiões de clima temperado e com temperaturas baixas durante a maior parte do ano. Regiões como o norte da Europa, sul da Austrália e porção central da América do Norte, possuem as mais altas taxas de prevalência, em torno de 300 casos/100.000 habitantes (Isobe *et al.*; 2016). Enquanto isso, as áreas com temperaturas mais elevadas, como África e zonas equatoriais, apresentam baixa prevalência com o número de casos inferiores a cinco casos/100.000 habitantes (Abreu, *et al.*; 2012; Cardoso *et al.*, 2006).

A figura 1 ilustra a distribuição mundial da EM.

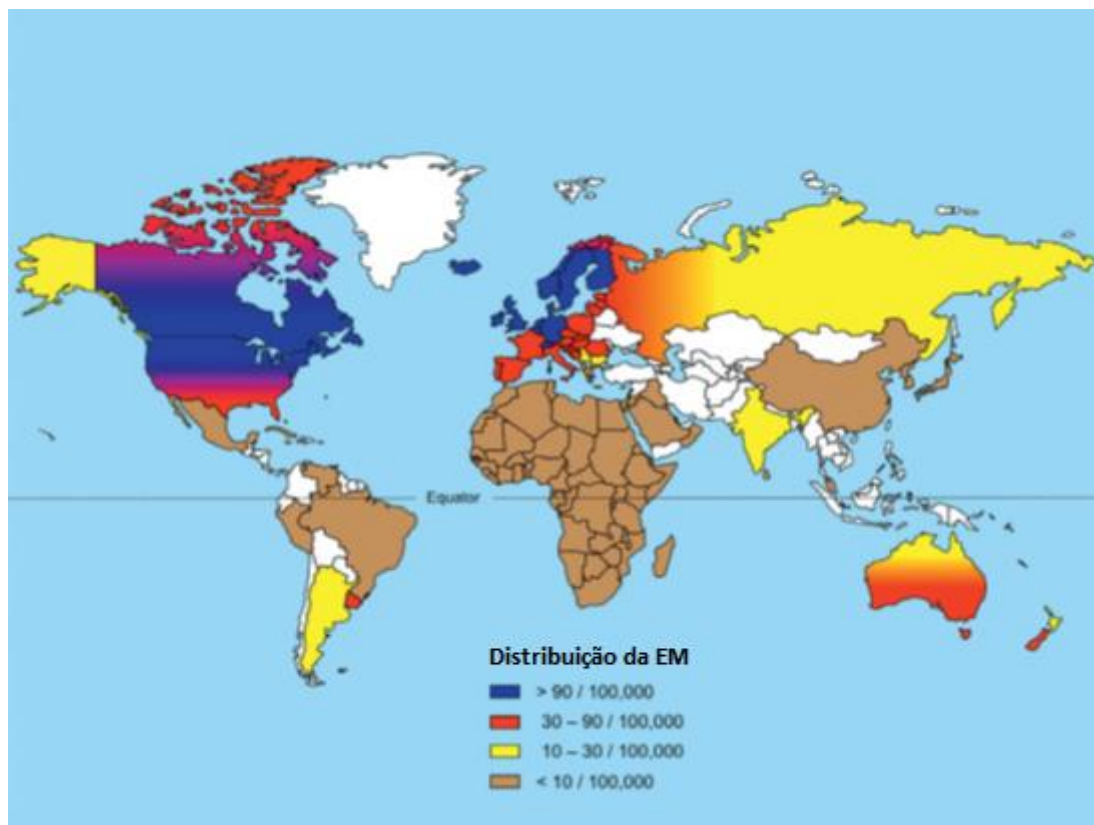


Figura 1. Distribuição da prevalência global da esclerose múltipla. A linha pontilhada representa a linha do Equador. Dados retirados de (Rosati, 2001; Compston *et al.*, 2006)

No Brasil, algumas regiões apresentam média incidência, como demonstram estudos realizados em cidades como São Paulo, Belo Horizonte e Botucatu (Peixoto *et al.*; 2002; Grzesiuk, 2011). Acredita-se que a diferença entre a prevalência nas diversas regiões do país seja explicada, em parte, pela diversidade genética e pela miscigenação da população. 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).

Em cada região do país, estudos epidemiológicos vêm sendo conduzidos em diferentes cidades ao longo de anos. O número de casos na região sudeste varia de 5-17/100.000 habitantes (da Gama Pereira *et al.*, 2015). Na região sul, por sua vez, em diferentes estudos foram observados de 15-27 casos/100.000 habitantes, incluindo-se nesta estatística a maior incidência no país, enquanto a menor incidência (1,36/100.000 habitantes) foi registrada na região Nordeste (revisado por (da Gama Pereira *et al.*, 2015).

1.3 Etiologia

Assim como a maioria das doenças crônicas, a EM tem bases etiológicas complexas envolvendo fatores ambientais e experiências vividas pelo indivíduo ao longo de sua vida juntamente com fatores genéticos, os quais contribuem para o desenvolvimento da doença ou para a proteção em relação a seu estabelecimento.

Diversos fatores têm sido relacionados ao desenvolvimento e à distribuição geográfica e racial da EM no mundo: aspectos geográficos, socioculturais, demográficos, estilo de vida e hábitos pessoais (estresse e tabagismo, por exemplo), além de fatores biológicos como infecção por vírus Epstein–Barr, herpes (HHV-6) e outros. Índices nutricionais, déficit de vitaminas, baixa exposição à luz solar e exposição a agentes tóxicos também são citados como fatores associados à EM (Compston *et al.*, 2006).

Além disso, vem sendo observada a associação da interação entre a vitamina D e o sistema imunológico, e a influência na etiologia da EM (Ascherio *et al.*, 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* (Cantorna, 2000; Deluca e Cantorna, 2001; Griffin *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2010; Nagpal *et al.*, 2005; Tavera-Mendoza e White, 2007; Teixeira e Costa; 2012).

Sabe-se que a produção *in vivo* de vitamina D ativa em mamíferos necessita da conversão do 7-deidrocolesterol em vitamina D e esse processo, por sua vez, necessita da exposição da pele à radiação ultravioleta B (UVB) (Holick, 1998; Hayes *et al.*, 2003; Nagpal *et al.*, 2005; Lips, 2006). De forma importante, conforme a latitude do posicionamento no globo aumenta (tanto para o norte como para o sul da linha do equador), a quantidade de radiação ultravioleta incidente reduz. Isso acontece devido ao aumento do ângulo de incidência da luz solar na atmosfera terrestre, tal circunstância aumenta a distância percorrida pela luz até a superfície do planeta nesses locais (Jablonski e Chaplin, 2000, 2002; Kimlin *et al.*, 2007).

É possível consumir a vitamina D₃ na dieta, mantendo os níveis necessários dessa vitamina no soro sem a necessidade de converter 7-deidrocolesterol. Porém, são poucas as fontes notórias de vitamina D₃, como alguns peixes oleosos e outros poucos animais (Gillie, 2006). Curiosamente, duas populações humanas com o risco para EM

notavelmente baixo, os Esquimós e os Lapões, possuem importantes fontes de vitamina D em suas dietas básicas (Sinclair, 1977; Koch-Henderson, 1995; Gronlie *et al.*, 2000; Gillie, 2006). Para as outras populações humanas, em contraste, a exposição da pele à radiação UVB é de primordial importância na manutenção dos níveis adequados de vitamina D₃ ao longo de todo ano (Gillie, 2006).

Com isso, diversos autores consideram que a distribuição da EM no mundo (Fig. 1) é consistente com o déficit de vitamina D (Adams, 1989; Rosati, 2001; Compston *et al.*, 2006; Jablonski e Chaplin, 2000, 2002), uma vez que a disposição de radiação UVB é consideravelmente reduzida nos locais com maiores números de casos. A figura 2 ilustra a distribuição de radiação UVB no mundo, indicando se os níveis são suficientes para a síntese adequada de Vitamina D, mas desconsiderando a dieta.

Do ponto de vista genético, a susceptibilidade individual para desenvolver EM é bastante influenciada pelo perfil étnico e histórico familiar, o que sugere que o componente genético tenha papel determinante no risco para a doença (Hollenbach, Ohseberg; 2015).

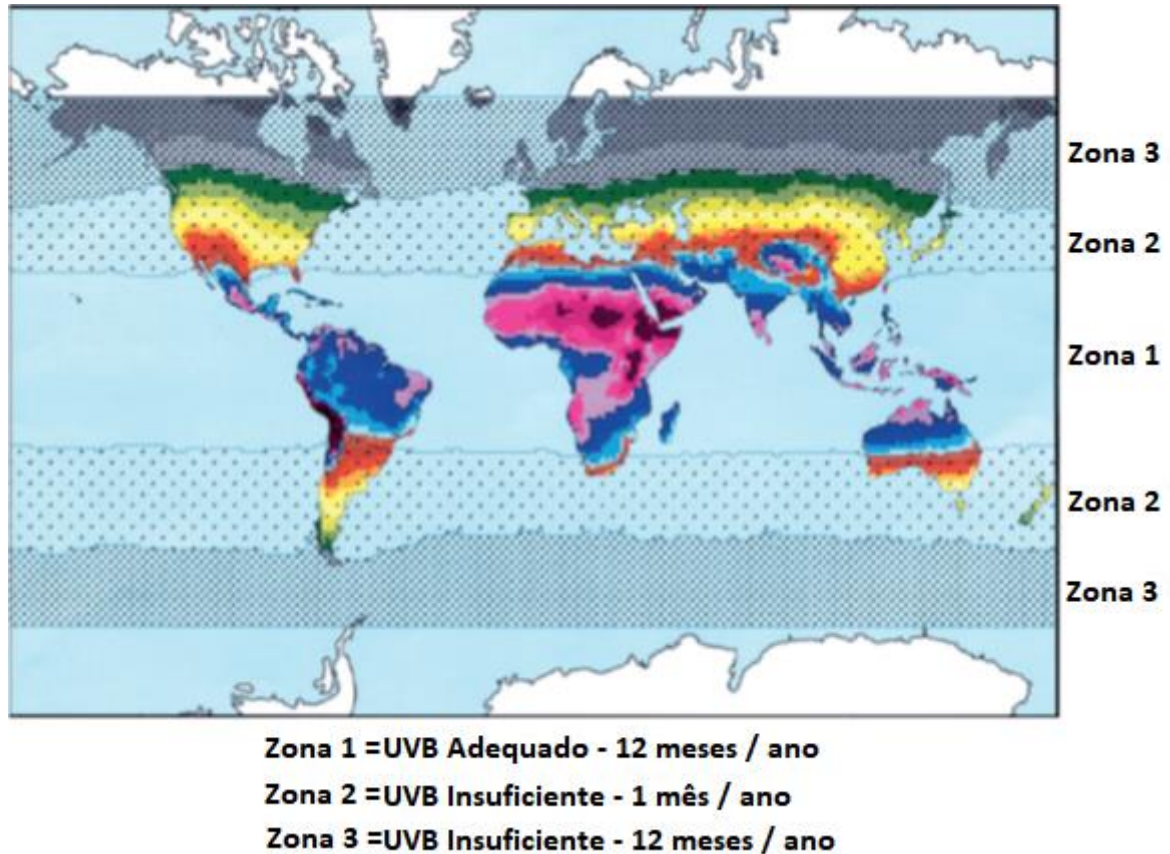


Figura 2. Distribuição da radiação ultravioleta B no mundo expressa pelo número de meses no ano considerados insuficientes para a produção adequada de vitamina D. A zona 2 apresenta uma variação na insuficiência representada pela variação de cores. O verde escuro indica UVB insuficiente por 11/12 meses. As zonas 1 e 3 também apresentam variações, mas na zona 1 todas as variações são adequadas e na zona 3 inadequadas (Jablonski e Chaplin, 2000).

Estudos mostram que o risco de um indivíduo com algum parente afetado desenvolver EM aumenta de acordo com a proximidade genética entre eles (Ebers *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1996; Sadovnick *et al.*, 1996; Compston and Coles, 2002; Ebers *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Compston *et al.*, 2006). Por exemplo, sobrinhas e sobrinhos de um paciente com EM têm as chances aumentadas de 5-10 vezes de apresentarem a doença ao longo de suas vidas. No caso de irmãos e irmãs, as chances chegam a aumentar 20-30 vezes comparando-se com a população na Europa, chegando estes valores em irmãos gêmeos monozigóticos a valores 200-300 vezes superiores aos da população em geral (Ebers *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1996; Sadovnick *et al.*, 1996; Compston e Coles, 2002; Ebers *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2005; Compston *et al.*, 2006). Porém, mesmo com forte predisposição genética, observou-se que outros fatores devem estar presentes para o

desenvolvimento da EM, uma vez que um irmão gêmeo monozigótico não apresenta 100% de chances de ser acometido quando o outro apresenta a doença (Mumford *et al.*, 1994; Ebers *et al.*, 1995; Willer *et al.*, 2003; Islam *et al.*, 2006; French Research Group on Multiple Sclerosis, 1992; Islam *et al.*, 2006; Ristori *et al.*, 2006). Mesmo assim, é consenso que características individuais influenciam diretamente na composição genética, atuando na etiologia da doença potencialmente por modulação do sistema imune (Lisak *et al.*, 1975; Chemaly *et al.*, 2000; Critchley, 2004; Hollembach E Okseberg; 2015; Binder *et al.*; 2016).

Atualmente, a associação genética melhor estabelecida com a susceptibilidade à EM está mapeada na região HLA, no cromossomo 6 humano (Willer *et al.*, 2003; Dymont *et al.*, 2005; Hafler *et al.*, 2007; Ramagopalan *et al.*, 2007; De Jager *et al.*, 2009; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium e Wellcome Trust Case Control Consortium 2, 2011). Nessa região, os alelos *HLA-DRB1**, e em especial os do grupo *HLADRB1*15*, desempenham papel importante na etiologia da EM, tendo já sido associados à doença em coortes de pacientes provenientes de Portugal (Silva *et al.*, 2007), Lituânia (Balnyte *et al.*; 2015), Canadá (Dymont *et al.*; 2005) e Brasil (Santos *et al.*; 2002; Grzesiuk, 2011; Paradela *et al.*; 2014). Portadores do alelo *HLADRB1*15:01* têm até três vezes mais chance de desenvolver EM quando comparados a não portadores desse alelo (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium e Wellcome Trust Case Control Consortium 2, 2011; Olerup e Hillert, 1991; Patsopoulos *et al.*, 2013). Além disso, o alelo *HLA-A*02:01* contribui como um fator protetor contra a EM, sendo o principal fator de proteção atualmente descrito na região do gene HLA de classe I (de Bakker *et al.*, 2006; Dilthey *et al.*, 2011; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium e Wellcome Trust Case Control Consortium 2, 2011; Horton *et al.*, 2008; Leslie *et al.*, 2008; Patsopoulos *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2002).

Outras associações com genes/variantes desempenhando menores efeitos também foram identificadas neste tipo de estudo, incluindo nas regiões do receptor de interleucina 2 α (IL2RA ou CD25), localizado no cromossomo 10p15 e do receptor de interleucina 7 α (IL7RA), localizado no cromossomo 5p13, sendo estas as duas primeiras associações fora da região HLA (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007). Um estudo posterior de associação gênica e uma meta-análise identificaram diversas associações nas regiões dos genes *CD58*, *TYK2*, *STAT3* e *TNFRSF1A* (Sawcer *et al.*, 2014). Em geral, os

dados obtidos nos estudos de associação genômica parecem corroborar a antiga hipótese de que a susceptibilidade para EM é afetada por variantes alélicas em múltiplos genes (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2010). De fato, já foram encontradas em meta-análises mais de 200 associações, e a soma de cada alelo associado à EM, levando-se em conta o peso do efeito de cada um, é definida como a carga genética da EM, podendo ser calculada para cada indivíduo (De Jager (A) *et al.*, 2009; Gourraud *et al.*, 2011; Patsopoulos *et al.*, 2017). Esta medição para o risco de desenvolver EM também é aplicada para a região HLA separadamente, uma vez que a carga genética da EM nessa região está associada ao início precoce da doença (Isobe *et al.*, 2016). Estes dados sugerem fortemente, através da arquitetura genética da doença, o importante papel do sistema imunológico na doença.

1.4 Sistema Imunológico e esclerose múltipla

Estudos patológicos e genéticos apontam para o sistema imunológico como ponto chave da EM. A inflamação durante a EM afeta apenas o SNC, sugerindo fortemente que células T e B são recrutadas seletivamente para resposta direcionada a um antígeno específico (provável auto antígeno) expresso somente no SNC. Apesar de diferentes antígenos alvo terem sido sugeridos ao longo do tempo, nenhum ainda foi confirmado (Gay *et al.*, 1997; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium e Wellcome Trust Case Control Consortium 2, 2011; Hohlfeld *et al.*, 2016; Schirmer *et al.*, 2014). A geração de linfócitos T e B responsivos requer uma célula apresentadora de antígeno (APC), como as células dendríticas. Atualmente, considera-se que esta resposta imunológica pode ser iniciada de duas formas: No modelo intrínseco, um evento inicial ocorre no SNC, levando à liberação de antígenos do SNC para a periferia. Os antígenos seriam então drenados para os linfonodos ou mesmo transportados por uma APC. Enquanto isso, o modelo extrínseco considera que o evento inicial se dá fora do SNC e culmina em uma resposta imunológica aberrante contra esse sistema. Neste caso, por exemplo, ocorreria uma disfunção nos linfócitos T reguladores (Treg), importantes supressores da inflamação (Gonsette *et al.*, 2012). Como evento inicial pode-se considerar uma reatividade entre antígenos de patógenos com autoantígenos ou a iniciação de uma resposta autoimune causada por um forte estímulo pró-inflamatório (Kutzelnig *et al.*, 2005).

Independente da forma de iniciação do processo, ambas as possibilidades levam a

dano tecidual, e acabam promovendo a inflamação e invasão do SNC por linfócitos T (Th1/Th17) através de quebra da barreira hematoencefálica. As células Th1 atravessam a barreira hematoencefálica utilizando a integrina VLA-4, já as Th17 podem utilizar a molécula de adesão celular MCAM (Flanagan *et al.*, 2012; Larochelle *et al.*, 2012; Schneider-Hohendorf *et al.*, 2014) e o antígeno de função associada a linfócito (LFA)-1 (Kebir *et al.*, 2009; Rothhammer *et al.*, 2011). A produção de citocinas inflamatórias por essas células promove a exacerbação da inflamação, recrutando novas células. Como resultado, placas de desmielinização estabelecem-se na substância branca cerebral (composta pelos axônios dos neurônios), levando à neurodegeneração (Compston, A. e Coles, 2008; Peterson *et al.*, 2001). Além disso, a substância cinzenta (composta majoritariamente pelos corpos celulares dos neurônios) também é afetada pela combinação de desmielinização, atrofia e morte neuronal (Dutta *et al.*, 2011; Wegner *et al.*, 2006).

As células Treg possuem um papel crucial no controle das células T autorreativas e na indução de tolerância periférica através de mecanismos imunossupressores. A capacidade supressora deste subgrupo é mediada principalmente pela secreção de citocinas anti-inflamatórias, como TGF- β e IL-10 (Vignali *et al.*, 2008). A diminuição do número e/ou da atividade de células Treg *naïve* (virgens) (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CD45RA⁺) pode ser compensada pela expansão de células Treg de memória, as quais no entanto não possuem o mesmo potencial de atividade imunossupressora, tornando a função deficitária (Haas *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2013). Além disso, o déficit das células Treg pode prejudicar a autotolerância das células B periféricas, ocorrendo o acúmulo de células B autorreativas na circulação (Kinnunen *et al.*, 2013). Como anteriormente mencionado, estas células são capazes de migrar através da barreira hematoencefálica utilizando a integrina VLA-4 e permanecem no SNC (Lee-Chang *et al.*, 2011) atuando na desmielinização principalmente via Imunoglobulina (Ig) G (Disanto *et al.*, 2012). Além disso, as células B autorreativas estimulam as células T via apresentação de antígenos no contexto do MHC de classe II e produção de IL-6 (Barr *et al.*, 2012; Molnarfi *et al.*, 2013). Em geral, a passagem das células T pela barreira hematoencefálica se dá concomitante à produção de metaloproteinases (MMP), que podem destruir a matriz endotelial, contribuindo para a patogenia do processo (Lisak *et al.*, 2012).

Em estudos utilizando um modelo animal para EM, a Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE), foi inicialmente observado que a neuroinflamação é causada pela

secreção de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pelas células T, sugerindo-se que tanto células Th1 quanto Th17 estariam envolvidas neste processo (Codarri *et al.*, 2011). Atualmente, sabe-se que esta secreção está ligada a uma população específica de células Th produtoras de GM-CSF na EM e EAE (Hartmann *et al.*, 2014; Sheng *et al.*, 2014; Noster *et al.*, 2014; Mindur *et al.*, 2014) e a um perfil patogênico de células T (CD11b⁺ CD4⁺) na EAE (Rolla *et al.*, 2014). Juntamente com o GM-CSF, o IFN- γ , a IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF)- α produzidos pelas células T autorreativas estimulam os macrófagos da micróglia induzindo diferenciação em um perfil pró-inflamatório durante a neuroinflamação (Bogie *et al.*, 2014). Em seguida, estas células produzem danos nos axônios e desmielinização ao secretar produtos solúveis, como espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e glutamato (Fischer *et al.*, 2012; Peferoen *et al.*, 2014), enquanto simultaneamente os neutrófilos secretam catepsina G e elastase (Naegele *et al.*, 2012; Wojkowska *et al.*, 2014).

As células da micróglia, assim como as células B, são capazes de reativar as células T autorreativas (Bogie *et al.*, 2014; Molnarfi *et al.*, 2013). Enquanto isso, as células T CD8⁺ citotóxicas têm como alvo as células residentes do SNC, como os oligodendrócitos, astrócitos e neurônios via reconhecimento mediado por MHC de classe I (Saxena *et al.*, 2011). Os danos causados à mielina podem promover um efeito chamado espalhamento de epitopos, que consiste na liberação e disseminação de determinantes antigênicos diferentes daqueles responsáveis pela iniciação da inflamação, favorecendo o reconhecimento desses em microambiente pró-inflamatório. O fenômeno favorece a recaída e a progressão da doença.

De forma intrigante, foram descritos agrupamentos de células da micróglia ativadas na substância branca aparentemente saudável, com a barreira hematoencefálica intacta e sem infiltração aparente de leucócitos (Melief *et al.*, 2013; van Horssen *et al.*, 2012). Acredita-se que estas características observadas poderiam representar o estágio inicial da doença, uma vez que o número de agrupamentos apresenta relação com o número de lesões ativas (Singh *et al.*, 2013).

Além disso, outro perfil de células Th foi descrito na EM, as Th22 (Rolla *et al.*, 2014). Esse novo subtipo celular está caracterizado pela secreção de Interleucina 22 (IL22) e altos níveis da molécula receptor de quimiocina C-C 6 (CCR6), que se liga ao CCL20 expresso nas células epiteliais do plexo coróide permitindo o acesso ao líquido

cefalorraquidiano (Rolla *et al.*, 2014). Essas células foram encontradas em números elevados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com a forma RR da EM, em especial durante a fase ativa da doença, sugerindo resistência à inibição pelo interferon β (IFN- β) (Rolla *et al.*, 2014). Contudo, ainda não se sabe o envolvimento dessa população de células com a patogênese da EM. É importante, porém, salientar que as células Th17 também podem chegar ao SNC via CCR6-CCL20 no plexo coroide (Reboldi *et al.*, 2009; Wojkowska *et al.*, 2014).

Como já foi mencionado, durante a fase RR da EM ocorre também a remissão da doença, que é caracterizada pela remielinização, parcial ou não, principalmente no início da EM (Podbielska *et al.*, 2013). Nesta fase, os macrófagos/micróglia pró-inflamatórios (M1) adquirem um fenótipo anti-inflamatório (M2) e se encarregam de limpar os restos de mielina (Kotter *et al.*, 2006). Portanto, o equilíbrio entre os fenótipos M1 e M2 pode ser um fator chave para a remielinização.

Após a fase RR, dois terços dos pacientes avançam para a fase secundária progressiva (Aktas *et al.*, 2010; Rovaris *et al.*, 2006). Neste momento da doença ocorre a expansão das lesões pré-existentes, sendo características imunológicas desta fase a presença de uma barreira hematoencefálica intacta e presença de centros germinativos de células T e B e células dendríticas nos folículos meníngeos no espaço subaracnóide (Howell *et al.*, 2011; Magliozzi *et al.*, 2010). Nos folículos meníngeos são produzidos fatores solúveis pró-inflamatórios que passam para o SNC e estimulam a micróglia, que são as principais responsáveis pela desmielinização e neurodegeneração na fase progressiva (Bradl *et al.*, 2009; Lassmann *et al.*, 2012; Romme *et al.*, 2013). Além disso, outros mecanismos, como o abalo no equilíbrio iônico axonal e o acúmulo de ferro pelos oligodendrócitos, são associados à fase progressiva (Lassmann *et al.*, 2012; Friese *et al.*, 2012). A Figura 3 apresenta um resumo da imunopatogênese nas fases RR e SP da EM.

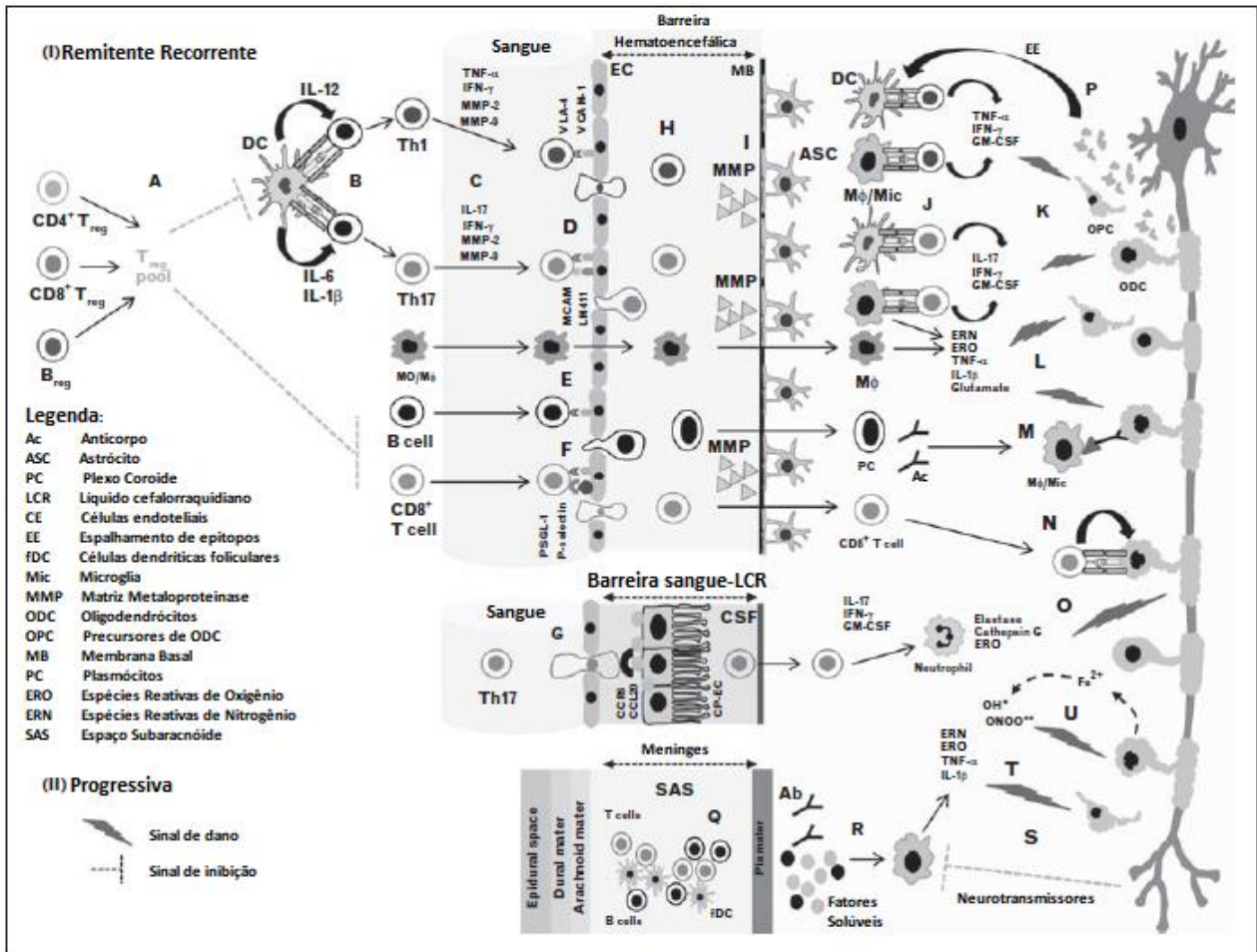


Figura 3. Imunopatogênese na fase RR (I) e progressiva (II) da EM. (A) Há uma redução no número de células Treg ($CD4^+FoxP3^+$), células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B autorreativas. (B) A apresentação de antígenos da mielina no linfonodo, por uma APC, provoca a diferenciação de células pró-inflamatórias (Th1/Th17). (C) Essas células desestabilizam a barreira hematoencefálica liberando MMP e citocinas pró-inflamatórias. (D) Células T (Th1/Th2) começam a atravessar a barreira. (E e F) Células B e T CD^+ atravessam a barreira hematoencefálica através da integrina VLA-4, as células T $CD8^+$ também utilizam ligante de glicoproteína P-selectina (PSGL). (G) As células Th17 podem chegar ao SNC via CCR6-CCL20 no plexo coroide. (H e I) O espaço perivascular (PVS) é ocupado por células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B, além de monócitos/macrófagos (MO/M ϕ), que produzem MMP-2 e MMP-9 para atravessar a membrana basal do parênquima (PBM) (Agrawalet *et al.*, 2013). (J e K) Células B, microglia e células dendríticas reestimulam os linfócitos T, que produzem mais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. (L) Produção de ERO, ERN e glutamato pelos macrófagos e microglia (MO/M ϕ), que causam danos aos axônios e promovem a desmielinização. (M) As células B se diferenciam a plasmócitos e secretam anticorpos, causando desmielinização por fagocitose. (N) Oligodendrócito expressando MHC de classe I se torna um alvo potencial para as células T $CD8^+$ citotóxicas. (O) Neutrófilos secretando ERO, elastase e catepsina G. (P) O espalhamento de epítomos (EE) leva ao reconhecimento de novos diferentes epítomos. (II) (Q) Formação dos folículos meníngeos na fase progressiva. (R e S) A microglia é ativada pelas citocinas solúveis e anticorpos produzidos nos folículos meníngeos. (T) Produção de citocinas inflamatórias, ERO e ERN pela microglia ativada. (U) Liberação de Fe^{2+} pelos oligodendrócitos, aumentando os danos oxidativos. Modificado de Yadav *et al.*, 2015.

1.5 Quimiocinas e seus receptores na Esclerose Múltipla

As quimiocinas são pequenas proteínas de 8 a 15 kDa, de 70-90 aminoácidos, que possuem importantes funções relacionadas ao sistema imunológico (Bajetto *et al.*, 2001; Mazur *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2010). Inicialmente foram descobertas pelas habilidades de interagir com seus receptores nas membranas das células, mediando o recrutamento e garantindo a movimentação de células tanto do sistema imunológico inato quanto do adaptativo nos variados microambientes anatômicos até o sítio da inflamação (quimiotaxia), além de atuarem na ativação de subpopulações linfocitárias *in vivo* e *in vitro* (Bajetto *et al.*, 2001; Banisadr *et al.*, 2005; Kurihara T. *et al.*, 1997). Sabe-se que as quimiocinas atuam tanto na indução do processo inflamatório como na imunorregulação (De Paepe *et al.*, 2008; Hembruff e Cheng, 2009; Koizumi *et al.*, 2007; Zabel *et al.*, 2006).

As quimiocinas são divididas em quatro subfamílias estruturais considerando a posição do motivo conservado de cisteína (C) na sequência: CXC (alpha), CC (beta), C (gamma), and CXC3 (delta) (Bendall *et al.*, 2005; Sorce *et al.*, 2011). As quimiocinas CXC são adicionalmente subdivididas entre as que possuem um motivo ácido glutâmico-leucina-arginina (ERL) próximo à porção amino-terminal (NH₂) e as que não possuem este motivo (não-ERL) (Müller *et al.*, 2010). Além da classificação estrutural, as quimiocinas são classificadas por suas funções primárias entre: quimiocinas inflamatórias, homeostáticas e de função dupla (envolvidas com ambas as funções) (Bendal *et al.*, 2005).

A ação de uma quimiocina é iniciada ao ativar seu receptor que apresenta sete domínios transmembrana acoplados à proteína G, induzindo a migração das células em resposta a um gradiente de concentração da molécula ligante (Mazur *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2000). Assim como seus ligantes, os receptores de quimiocinas são classificados entre: CXCR, CCR, CR e CX3CR e essas moléculas transmembranas de 340 a 370 aminoácidos podem ser expressas em diversos tipos celulares (Xia *et al.*, 2000; Zlotnik *et al.*, 2000). A ativação dos receptores de quimiocina leva a uma alteração de GDP para GTP ligado à subunidade α da proteína G. Em seguida, a subunidade se desacopla da proteína G e ativa uma cascata de eventos no citoplasma que culminará no efeito biológico (Fernandez *et al.*, 2002).

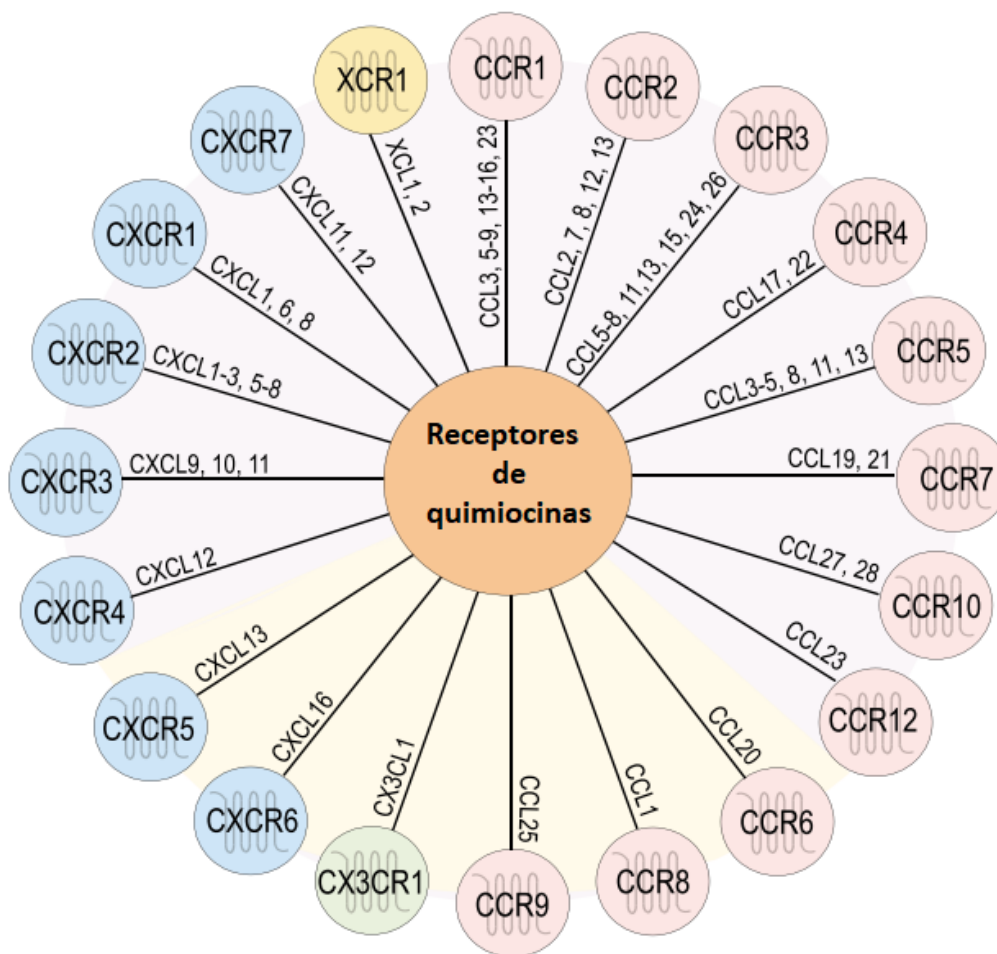


Figura 4. Quimiocina e seus receptores. Os receptores de quimiocinas estão representados dentro dos círculos, com as respectivas quimiocinas ligantes indicadas sobre as linhas pretas. (Modificado de White *et al.*, 2013)

Atualmente, são conhecidas aproximadamente 50 quimiocinas e 20 receptores de quimiocina, significando que diferentes quimiocinas compartilham o mesmo receptor. Por outro lado, uma quimiocina pode ser ligada individualmente a diferentes receptores. Porém, já foram observadas interações únicas (monogâmicas) entre quimiocinas e seus receptores (Bendall *et al.*, 2005).

É amplamente reconhecido que o recrutamento dos leucócitos ao sítio de inflamação é uma etapa importante na EM. Como já foi descrito anteriormente, linfócitos T atravessam a barreira hematoencefálica com a participação de quimiocinas. Para desvendar o envolvimento das quimiocinas, Simpson *et al.* examinou tecidos do SNC de pacientes em diferentes estágios de lesões da EM (Simpson *et al.*, 2000). Seus resultados sugeriram uma

sequência de eventos: as células T expressam IFN- γ no ambiente perivascular, que induz as células gliais a expressarem CXCL9 e CXCL10, recrutando seletivamente linfócitos T que expressam CXCR3 para sítio de inflamação (Simpson *et al.*, 2000).

Mahad *et al.* mostraram um aumento significativo nas concentrações de CXCL10 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM, utilizando indivíduos com cefaleia benigna como grupo controle (Mahad *et al.*, 2002). De forma notável, as concentrações de CXCL10 foram maiores em pacientes com a forma RR do que em pacientes na fase SP. Além disso, dados sugerem que os níveis de CXCL10 tendem a diminuir após a fase inflamatória, sugerindo um papel desta quimiocina na inflamação e, possivelmente, na desmielinização (Mahad *et al.*, 2002). No mesmo estudo, os autores correlacionaram CXCL10 à expressão de CXCR3 nos linfócitos T CD4⁺ do líquido cefalorraquidiano, e concluíram que essa correlação pode ser explicada pelo papel atrativo do CXCL10 em relação a linfócitos ativados (Mahad *et al.*, 2002).

1.6 CCR5 na Esclerose Múltipla

Embora o CCR5 seja constitutivamente expresso em células residentes do SNC (neurônios, micróglia e astrócitos), os mecanismos fisiológicos de ação desta molécula específica neste local permanecem obscuros (Westmoreland *et al.*, 2002). Sabe-se que humanos e camundongos que não possuem CCR5 funcional não apresentam anormalidades neurológicas associadas à ausência deste receptor e já foi sugerido que isto ocorre devido à redundância de membros tanto da família de CCRs quanto de outros receptores semelhantes. Mesmo assim, linhas de pesquisa indicam papéis importantes deste receptor associados ao SNC, como ativação do fluxo de cálcio e diferenciação de neurônios (Klein *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2009).

Populações de células Th1 no líquido cefalorraquidiano durante a EM RR que secretam MM-9 para desestabilizar e passar pela barreira hematoencefálica também expressam amplamente CCR5 em suas membranas (Sato *et al.*, 2012). Além disso, foi observado que CCR5 é altamente expresso em macrófagos/micróglia, células T CD8 e monócitos presentes no sítio da inflamação durante a fase aguda da EM RR (Trebst *et al.*, 2001). Acredita-se que a molécula CCR5 poderia estar contribuindo para o recrutamento e a ativação dessas células (Sato *et al.*, 2012). Em apoio a esta hipótese, um estudo utilizando

um antagonista sintético de CCR5, CXCR3 e CCR2 (TAK-779) em camundongos com EAE, reduziu a inflamação no SNC, e com isso, a severidade da doença (Ni *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2011). Em outro estudo, a neutralização combinada dos ligantes do CCR5 (CCL3, CCL4 e CCL5) suprimiu o quadro da EAE em andamento (Sapir *et al.*, 2010). Nesse caso, é importante ressaltar que cada um dos três ligantes do CCR5 pode interagir com outros receptores. Com isso, os efeitos obtidos podem não estar relacionados somente com o CCR5, mas resultarem de um conjunto de diversos mecanismos de interação um uma rede de moléculas associadas.

Atualmente, mutações e polimorfismos genéticos estão sob investigação por potencialmente interferirem na expressão das quimiocinas e seus receptores. Sabe-se que o gene que codifica o *CCR5* está localizado na região p21.3 do cromossomo 3 humano (Vargas *et al.*, 2006). O polimorfismo mais investigado neste gene é uma deleção de 32 pares de bases dentro da região codificante do *CCR5*, que altera o quadro de leitura e gera uma proteína truncada, que não é expressa na superfície da célula. O alelo responsável por esta variação é denominado *CCR5Δ32* (Liu *et al.*, 1996). Dessa forma, o indivíduo heterozigoto tem perda parcial da expressão, enquanto o indivíduo homozigoto para o alelo variante tem a perda completa da expressão do receptor funcional (Kohem *et al.*, 2005).

A prevalência deste alelo polimórfico varia de acordo com a etnia do indivíduo, em populações europeias a frequência da variante *CCR5Δ32* está entre 3-12%, sendo a mesma ausente em nativos africanos, asiáticos e ameríndios. Cerca de 1% da população europeia é homozigota para o polimorfismo (Mañes *et al.*, 2003). A hipótese de que o alelo tem origem no norte da Europa (Sidoti *et al.*, 2005; Libert *et al.*, 1998), vem sendo corroborada pela maior frequência nessa região (Martinson *et al.*, 1997; Lucotte, G. e Mercier, 1998; Battiloro *et al.*, 2000; Papa *et al.*, 2000), além de uma tendência de gradiente linear do norte para o sul em populações da Europa em geral (Sidoti *et al.*, 2005; Libert *et al.*, 1998). Nas populações Brasileiras, a frequência do *CCR5-delta32* varia de 4,2% na região Norte a 6,4% na Sul. Quando estratificadas por origem étnica, as frequências são baixas entre afro-descendentes, variando de 0,7% a 2,6% enquanto entre euro-descendentes do Rio Grande do Sul a frequência alcança até 6,6% (Vargas *et al.*, 2006)

Como a perda de função desse receptor está potencialmente associada com a redução da infiltração de linfócitos no SNC, alguns estudos investigaram diferentes coortes de pacientes com EM, sendo encontrados resultados conflitantes. De forma intrigante,

indivíduos homozigotos para o *CCR5Δ32* podem desenvolver a EM, apesar desta variante genética já ter sido associada como um fator de proteção diversos estudos (Barcellos *et al.*, 2000; D'Angelo *et al.*, 2011; Kaimen-Maciel *et al.*, 2007; van Veen *et al.*, 2007). Na verdade, dados conflitantes existem na literatura, pois além do acima citado, a mesma variante já foi identificada como um fator de risco para EM (Gade-Andavolu *et al.*, 2004; Luomala *et al.*, 2003; Pulkkinen *et al.*, 2004; Shahbazi *et al.*, 2009) ao passo que alguns estudos não reportaram qualquer associação com EM (Brassat *et al.*, 2006; Motsinger *et al.*, 2007; Ristic *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2014).

1.7 Enzimas Metabólicas

A maior parte das enzimas metabólicas de xenobióticos (compostos químicos estranhos ao organismo) exibe polimorfismos genéticos que levam a variantes com diferentes eficiências de sua capacidade de processamento (Wilkinson & Clapper, 1997). Dessa forma, alguns genes são utilizados como marcadores de susceptibilidade para diversas doenças.

Em geral, os processos de metabolização de xenobióticos ocorrem em duas etapas. As principais enzimas responsáveis pela fase I de detoxificação, também chamadas de enzimas de ativação, são membros da superfamília do citocromo P450 (CYP), uma superfamília de monooxigenases. Essas enzimas catalisam a biotransformação de diversos xenobióticos, como drogas, substâncias químicas tóxicas e carcinógenos, além de substratos fisiológicos como esteroides, ácidos graxos, prostaglandinas, leucotrienos e aminas biogênicas (Bozina *et al.*, 2009; Maglich *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005). Na reação, é gerado um grupo funcional que pode subsequentemente servir como sítio de conjugação, tornando o alvo reativo para as enzimas de fase II (Bozina *et al.*, 2009; Maglich *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005). As enzimas de fase I são encontradas majoritariamente nas membranas dos ergastoplasmas em células hepáticas, mas podem ser encontradas em diversos órgãos como intestino, pulmão, rins e cérebro.

As enzimas de fase II, ou de detoxificação (UDP-glucuronosil transferases, Sulfo-transferases, Glutathione-S-transferases e N-acetil-transferases), por outro lado, normalmente atuam na conjugação dos metabólitos com um substrato endógeno, com atividade relacionada a enzimas transferases. O resultado destes processos enzimáticos é de

extrema importância para o organismo, já que consiste na transformação dos metabólitos lipofílicos em substâncias hidrofílicas, passíveis de excreção (Bozina *et al.*, 2009; Guecheva & Henriques, 2003; Maglich *et al.*, 2002; Wilkinson & Clapper, 1997; Xu *et al.*, 2005).

1.8 A superfamília Glutathione S-transferase

A superfamília glutathione S-transferase é composta por proteínas multifuncionais amplamente distribuídas na natureza, estando presente em eucariotos e procariotos (Allocati *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2012). Em eucariotos, as GST são classificadas de acordo com a localização celular, e as três maiores famílias correspondem às GST citosólicas, mitocondriais e microsossomais (Sheehan *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2011). A família mais diversificada é a citosólica, que é dividida em outras classes de acordo com as propriedades químicas, físicas e estruturais. As GST mitocondriais, também conhecidas como classe *kappa*, possuem semelhanças estruturais com as citosólicas, enquanto as microsossomais são proteínas integradas à membrana e diferem evolutivamente e estruturalmente das demais (Sheehan *et al.*, 2001; Oakley *et al.*, 2011).

As GSTs são enzimas detoxificantes de fase II que possuem múltiplos papéis biológicos, sendo necessárias para a proteção das células contra estresse oxidativo e moléculas tóxicas, além de serem importantes para a síntese e modificação de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona e progesterona (Hayes *et al.*, 2005). De forma importante, as GST atuam como protetoras do DNA celular contra danos oxidativos que podem promover mutações e levar à carcinogênese. Especificamente, elas inativam aldeídos alfa e beta-insaturados, quinonas, epóxidos e hidroperóxidos, que são metabólitos secundários formados durante o estresse oxidativo (Li *et al.*, 2009). As GSTs são capazes de conjugar glutathione endógena a uma ampla variedade de moléculas hidrofóbicas, dentre elas carcinógenos, drogas terapêuticas e produtos do metabolismo, tornando essas moléculas menos tóxicas e predispostas à modificação (Hayes *et al.*, 2005). Embora a grande maioria dos conjugados de glutathione represente produtos de detoxificação, existem muitos exemplos onde a atividade das enzimas GSTs não resulta na detoxificação, mas na ativação do xenobióticos (Autrup, 2000). A figura 5 ilustra a cadeia de eventos da biotransformação de xenobióticos.

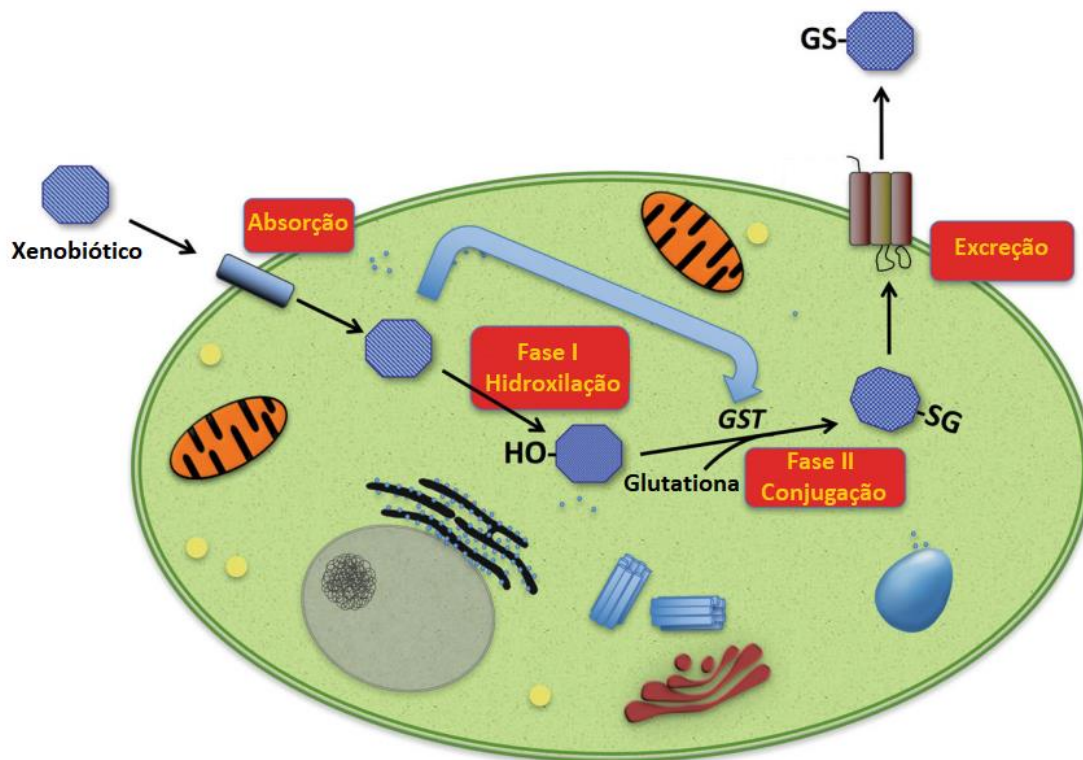


Figura 5. Visão geral da biotransformação enzimática de xenobióticos. Moléculas prejudiciais podem passar pela membrana plasmática. Enzimas de Fase I atuam catalisando possíveis reações de oxidação/redução e hidroxilação (a mais comum). Em seguida, enzimas da família GST (principais representantes da Fase II) catalisam a conjugação com a glutatona endógena. O conjugado resultante é ativamente transportado para fora da célula por mecanismos de transporte através da membrana. Alguns compostos entram diretamente no metabolismo de Fase II.

Em humanos, as GST citosólicas são classificadas em: *alpha*, *zeta*, *theta*, *mu*, *pi*, *sigma* e *omega* (Oakley *et al.*, 2011) e são codificadas em diversos genes localizados em diferentes cromossomos. Polimorfismos têm sido descritos em muitos genes nestes grupos e mais atenção tem sido dada aos grupos *mu* e *theta*. Sabe-se que os cinco genes da família *mu* (M1-M5) estão localizadas em *tandem* no cromossomo 1p13.3, enquanto os dois genes da família *theta* (T1 e T2) estão no cromossomo 22 (Strange *et al.*, 2001).

No gene *GSTM1* foram descritos três alelos polimórficos: *GSTM1*0*, *GSTM1*A* e *GSTM1*B*. O alelo *GSTM1*0* resulta de uma deleção completa do gene, enquanto os outros dois alelos (*GSTM1*A* e *GSTM1*B*) codificam monômeros que resultam em enzimas diméricas ativas e diferem entre si por uma substituição de um C por um G na posição 534 (Di Pietro *et al.*, 2010; Rebbeck, 1997; Strange *et al.*, 2001).

O gene *GSTT1* está localizado no cromossomo 22q11.2 e assim como no caso do gene *GSTM1*, foi identificado um alelo nulo em *GSTT1*, o *GSTT1*0*. Dessa forma, a homozigose para os dois alelos nulos *GSTM1*0* e *GSTT1*0* está associada com detoxificação deficitária e com riscos aumentados para câncer colorretal, de pele, pulmão, estômago, bexiga e próstata (Cotton *et al.*, 2000; Engel *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2002; Geisler *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2006; Knudsen *et al.*, 2001; Reszka & Wasowicz, 2000; Wang *et al.*, 2003).

A distribuição dos fenótipos nulos de *GSTM1* e *GSTT1*, devido à deleção total ou parcial resultando na baixa atividade enzimática, tem sido investigada em diferentes populações humanas (Garte *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2001; Gaspar *et al.*, 2002). O alelo *GSTT1*0* é relativamente comum na Ásia (60%) e incomum em outras populações, incluindo europeus (Dusinska *et al.*, 2001). Estudos reportam uma prevalência de 47-58% para o alelo nulo de *GSTM1* em populações caucasianas europeias e de 13-25% para o alelo nulo de *GSTT1* nas mesmas populações (Garte *et al.*, 2001; Rebbeck, 1997). Nos Estados Unidos, a população euro-descendente apresenta uma prevalência de aproximadamente 27,6% do genótipo nulo para *GSTT1* (Garte *et al.*, 2001). A distribuição entre afro-americanos e africanos está entre 20-24% para o alelo nulo de *GSTT1* (Abdel-Rahman *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1995).

No Brasil, o genótipo nulo de *GSTT1* tem a prevalência entre 21,1% (Rio Grande do Sul) e 22,3% (Bahia) em caucasianos, enquanto em Afro-descendentes a prevalência varia entre 28% (Rio grande do Sul) e 26,3% (Bahia) (Gaspar *et al.*, 2004; Gattás *et al.*, 2004; Kvitko *et al.*, 2006). Já o genótipo nulo de *GSTM1* tem prevalência de 55,4% entre Euro-descendentes e 32,2% em Afro-descendentes (Gattás *et al.*, 2004).

1.9 GST na Esclerose Múltipla

A importância do estresse oxidativo na patogênese da EM vem sendo evidenciada por diversos estudos, o que justifica a investigação genes candidatos que participam na resposta antioxidante celular (Miller *et al.*, 2010; van Horssen *et al.*, 2011; Ghabaee *et al.*, 2010). Como já mencionado anteriormente, as respostas inflamatórias elevam a produção das ERO e ERN, que estão relacionadas à perda da integridade da barreira hematoencefálica e invasão dos linfócitos ao SNC e, por fim, à desmielinização e danos

neuronal (van Horssen *et al.*, 2011; Dringen *et al.*, 2005; Witherick *et al.*, 2010).

O cérebro é particularmente vulnerável ao dano oxidativo devido ao alto consumo de oxigênio, baixos níveis de antioxidantes e altos níveis de fosfolipídios (Miller *et al.*, 2011; Usatyuk *et al.*, 2012). A peroxidação dos lipídios presentes nas membranas resulta na formação de fosfolipídios oxidados e aldeídos reativos, os quais podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Miller *et al.*, 2011; Usatyuk *et al.*, 2012). Além disso, o dano oxidativo está associado à lesão mitocondrial, que pode induzir a apoptose em oligodendrócitos e disfunção dos astrócitos (Haider *et al.*, 2011).

Na sociedade moderna, indivíduos podem ser expostos a diversos componentes químicos como chumbo, cádmio e arsênico, pelo ar, água, fumo ou até mesmo pela comida (Bian *et al.*, 2015; Farzin *et al.*, 2008). Foi demonstrado que cádmio é capaz de provocar o aumento da concentração de peróxido lipídico em ratos, além de alterar a atividade de enzimas antioxidantes (Jomova&Valko, 2011). O chumbo danifica células através do aumento do estresse oxidativo, assim como o arsênico. O efeito do chumbo é múltiplo, capaz de interromper diretamente a atividade de enzimas, inibir competitivamente a absorção de minerais importantes, dentre outros mecanismos (Jomova & Valko, 2011; Patrick, 2006). Vem sendo investigada a correlação entre exposição a metais pesados com os riscos de desenvolver EM, juntamente com os polimorfismos nos genes das GSTs (Aliomrani *et al.*, 2017).

A oxidação de nucleotídeos pelas ERO parece aumentar a resposta imunológica contra moléculas de DNA. Importaneamente, foi descrito o acúmulo de epitopos, nucleotídeos e até mesmo tecidos oxidados na mielina, oligodendrócitos e axônios em locais apresentando lesões relacionadas à EM (Halliwell, 1995; van Horssen *et al.*, 2011). Dessa forma, a detoxificação é extremamente importante e merece destaque na proteção contra a EM. Genes e proteínas relacionadas à metabolização/detoxificação de xenobióticos estão sendo investigados em diversas doenças nas quais a etiologia está relacionada à exposição a fatores ambientais.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os possíveis papéis do CCR5 e das GSTs no desenvolvimento da esclerose múltipla, analisando aspectos genéticos e clínicos nos pacientes para comparar com grupo controle (estudo caso/controle). Além disso, avaliar a relação desses parâmetros com a severidade e progressão da doença.

Objetivos Específicos

- Analisar a frequência dos alelos polimórficos *CCR5Δ32* nos pacientes com Esclerose Múltipla e no grupo controle para compará-los.
- Verificar uma possível correlação entre a presença do *CCR5Δ32* e a severidade da Esclerose Múltipla nos pacientes.
- Avaliar a presença do genótipo nulo da *Glutathione-S Transferase T1* nos pacientes e no grupo controle e correlacionar estatisticamente os dados.
- Analisar a severidade e a progressão da doença de acordo com a presença do genótipo nulo *GSTT1*0*.
- Obter os dados clínico-patológicos (EDSS e MSSS) dos pacientes e relacioná-los com os dados laboratoriais.

CAPÍTULO 3

CCR5 Δ 32 – a piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility

Accepted Manuscript

CCR5 Δ 32 – a piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility

Lian Lopes Troncoso, Alessandra Pontillo, Enedina Maria Lobato de Oliveira, Alessandro Finkelsztejn, Silvete Schneider, José Artur Bogo Chies

PII: S0198-8859(18)30139-3
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.015>
Reference: HIM 10066

To appear in: *Human Immunology*

Received Date: 14 March 2018
Revised Date: 25 April 2018
Accepted Date: 26 April 2018

Please cite this article as: Troncoso, L.L., Pontillo, A., de Oliveira, E.M.L., Finkelsztejn, A., Schneider, S., Chies, J.A.B., CCR5 Δ 32 – a piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility, *Human Immunology* (2018), doi: <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.04.015>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



CCR5 Δ 32 – a piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility

Lian Lopes Troncoso¹, Alessandra Pontillo², Enedina Maria Lobato de Oliveira⁴, Alessandro Finkelsztejn³, Silvete Schneider³, José Artur Bogo Chies^{1*}

¹Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brasil.

²Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, São Paulo SP, Brasil.

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre RS, Brasil.

⁴Ambulatório de Doenças Desmielinizantes da disciplina de Neurologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo SP, Brasil.

*Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratório de Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre - RS, Brazil, Phone: +5551 33086737. E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Background. Leucocyte infiltration and activation in the central nervous system (CNS) is an important step in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS). The Chemokine receptor 5 (CCR5) is implicated in immune cell migration and cytokine release in the CNS, and it was demonstrated to strongly contribute to CNS inflammation and damage in several models of sterile and pathogen-mediated CNS diseases. Although the inhibition of CCR5 results in a beneficial effect in experimental models of MS, conflicting results have been found about the loss-of-function variant CCR5 Δ 32 (rs333) in MS patients. The aim of this study was to evaluate the association of CCR5 Δ 32 and MS in a Brazilian case/control cohort. **Patients and Methods.** 261 MS patients and 435 healthy controls were genotyped for CCR5 Δ 32. Allelic and genotypic frequencies were compared between patients and controls (case/control analysis), and among patients classified according to the MS clinical form (relapsing remitting versus progressive) and severity (EDSS, MSSS and progression index). **Results and Discussion.** The CCR5 Δ 32 variant frequency was statistically higher in controls as compared to patients presenting European-derived ethnic background. The variant was more frequent in progressive MS as compared to RR-MS patients, and, although not statistically significant, a higher frequency of the truncated allele was observed among patients with less severe forms of MS. These findings emphasize the potential involvement of CCR5 signaling in CNS inflammation and damage in MS. **Conclusion.** The CCR5 Δ 32 deletion is a protective factor against the development and progression of MS in European-derived Brazilian patients.

Keywords: Immunogenetics, Multiple sclerosis, Central Nervous System, CCR5 Δ 32.

1. Introduction

Autoimmune responses in the central nervous system (CNS) play a critical role in the chronic inflammation and demyelination that occurs in human multiple sclerosis (MS). Although it is known that autoimmunity results from the interaction of genetic and environmental factors, the mechanisms leading to such phenomenon remain only partially understood [1,2]. Importantly, it is established that axonal and neuronal loss begins at the earliest stages of the disease, resulting in cognitive impairment and other early disabilities [3,4].

To date, the International Advisory Committee on clinical trials in MS defines two different MS phenotypes classifying them in relapsing-remitting (RR) MS and Progressive MS [5]. RR MS is characterized by discrete episodes of acute neurological deficits and/or worsening of a given neurological function, followed by a complete or partial recovery, although Progressive MS, which includes secondary progressive (SP) and primary progressive (PP) MS, is characterized by a progressive accumulation of disability from the onset of the disease without identifiable acute relapses [6]. Progressive MS presents a similar prevalence independently of sex, and has a delayed onset as compared to RR MS (by ~10 years) [6]. RR MS is the most common MS phenotype (~85% of total cases) and has a female to male prevalence between 2:1 and 3:1 [5].

It is well known that efficient signaling is required to the correct recruitment of immune cells to inflammatory sites. Acting in such signaling, chemokines are mediators of cell trafficking that, when secreted, interact with their respective cell surface receptors and mediate the recruitment of immune cell subpopulations [7]. It is postulated that chemokines and their receptors participate in the development of MS through the recruitment of leucocytes towards the CNS. The Chemokine receptor 5 (CCR5) belongs to the superfamily of seven transmembrane domains receptors and is coupled to G protein. CCR5 ligands include CCL3 - macrophage inflammatory protein (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 - regulated on activation normal T cell expressed and presumably secreted (RANTES) and CCL8 - monocyte chemoattractant protein (MCP-2) [8].

CCR5 is mainly expressed on the surface of monocytes and distinct lymphocyte subtypes (such as NK, CD4+ and CD8+ T cells) and contributes to the trafficking of these cells into the CNS and in their consequent activation and induction to cytokine release [7,8,9]. Experimental model of MS (experimental autoimmune encephalomyelitis/EAE) [10,11] and data from patients (Reviewed by Martin-Blondel et al, 2009) [12] point to a role of CCR5 in the development and/or progression of MS.

Similar to other autoimmune diseases, and taking into account the heterogeneity of clinical presentation and progression, an important genetic contribution has been postulated for MS, especially considering immune related genes (as reviewed by Jokubaitis VG, Mol Cell Probes. 2016) [13]. The *CCR5* gene is located on chromosome 3p21.3-p24, and the most investigated polymorphism at this gene is a 32 base pair deletion (*CCR5*Δ32; dbSNP: rs333), which generates a truncated protein that does not reach the cell surface [14]. Since this loss-of-function variant is potentially associated with reduced leukocyte infiltration in CNS, it was previously investigated in distinct cohorts of MS patients, but conflicting results emerged. Thus, this genetic variant was associated as a risk factor in some MS cohorts [15,16,17,18], although it was associated as a MS protective factor in other human populations [19,20,21,22]. Finally, some studies fail to evidence any association to MS [23,24,25,26]. Considering those conflicting results, the aim of the present study was to evaluate the contribution of *CCR5*Δ32 in the development, clinical presentation and progression of MS in a large Brazilian cohort. We also present a comprehensive review of the literature, highlighting the potential influences of both the presence, as well as the absence, of such chemokine receptor in multiple sclerosis patients.

2. Methods

2.1 Patients and controls

A total of 261 MS patients (man/women: 56/192, 13 patients with no sex information; mean age: 48±12.1 years) were recruited at the ambulatory of demyelinating diseases, at the Hospital de São Paulo - Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP (São Paulo, SP, Brazil), and at the Neurology Clinic of the 46

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), both institutions located in the southern Brazilian region. 435 healthy individuals representative of the urban population of this region, and belonging to a DNA bank established at the Laboratory of Hemostasis, Department of Genetics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RG, Brazil), were included as a control group (described in Chies & Hutz, 2003; Kohem et al., 2007) [27,28]. The study was approved by the Research Ethics Committee of the three Institutions and informed consent was obtained from all the enrolled individuals. Clinical and demographic features of patients are presented in Table 1.

A total of 112 MS patients were diagnosed as RR-MS, 92 as Progressive-MS and 57 presented an undefined type of MS, according to McDonald criteria (Revised by Polman, et al., 2011) [29]. Severity of the disease was assessed by Expanded Disability Status Scale (EDSS) rank. Ethnic origin of all patients was determined based on physical appearance judged by the researcher at the time of blood collection and on data reported by the participants.

2.2 DNA isolation and CCR5 genotyping

Total genomic DNA was isolated from peripheral blood by a standard salting-out method [30], and the purified DNA was stored at -20°C until use. Polymerase chain reaction (PCR) was performed with specific primers flanking the 32 bp deletion region to analyze the CCR5 Δ 32 variant (rs333). The PCR product was visualized on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide, as previously described [27].

2.3 Statistical analysis

CCR5 Δ 32 genotypic frequencies were compared with Hardy-Weinberg (HW) expectations using chi square tests. Allelic and genotypic frequencies were compared among patients and control groups and among patient groups using the Chi-square test and Fisher's exact test. Relative risks were estimated by odds ratio (OR) and the Mann-Whitney test was used to analyze the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) ranks. For evaluation of the data, SPSS software version 22.0 was used. Multivariate analysis based on General Linear Model (GLM) was

executed using the R-project package “SNP-assoc”. Sex, age and ethnic origin were included as confounder variables in the case/control analysis. Sex, ethnic origin, age at diagnosis, and/or time of disease were included as confounder variables in the clinical features analyses.

3. Results

The distribution of genotypes in the cohort was consistent with frequencies expected for Hardy-Weinberg equilibrium. Taking all patients together the observed allelic frequency of the CCR5 Δ 32 variant was intermediate between the frequencies described for Caucasian and African populations in a southern Brazilian admixed population [31]. Among patients, 244 (0.94) were wild type homozygous, 17 (0.03) were heterozygous and no homozygous for the deletion were observed. Among the healthy controls, 396 (0.91) were wild type homozygous, 37 (0.08) were heterozygous and 2 (0.01) were homozygous for the deletion. No statistical differences were observed between patients and controls concerning allelic and genotype frequencies even adding sex, age and ethnic background as confounder variables (Data not shown).

CCR5 Δ 32 and MS stratified according to the ethnic origin

Considering that rs333 is typically associated to European and European-derived populations, individuals from both the study cohort and controls were identified as European-derived or African-derived, according to the Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) ethnicity classification methods [32]. 21 patients had no information about this feature. Thus, amongst the European-derived individuals, a statistically significant higher frequency of the CCR5 Δ 32 variant was observed in controls (n=235) as compared to the patients (n=166) (OR= 0.42, 95% CI= 0.19-0.88, p=0.013). The frequency of individuals carrying the deletion (both wt/ Δ 32 and Δ 32/ Δ 32) was lower in patients as compared to controls, suggesting a protective role of this variant against the development of MS (OR=0.46, 95% CI=0.20-0.98, p=0.033 for wt/wt vs wt/ Δ 32) (Table 2). There was no significant difference in the variant distribution between patients (n=74) and controls

(n=200) in the African-derived group (OR= 1.35, 95% CI=0.21-6.67, p=0.708), although it should be highlighted the small number of patients classified into this group (Table 2).

CCR5Δ32 and MS clinical features

Results concerning the distribution of the polymorphism among the MS patients classified according to the clinical form are summarized in Table 3. When all patients were evaluated together, independently of the ethnic origin, the CCR5Δ32 variant was more frequent in P-MS as compared to RR-MS, although this result did not reach statistical significance ($p_{adj}=0.367$). Also, when stratified according to the ethnic background, a higher frequency of the CCR5Δ32 was observed in P-MS as compared to RR-MS patients ($p=0.189$; OR=2.53) amongst European-derived individuals. This result remained significant when corrected for sex, age at diagnosis and time of disease ($p_{adj}=0.044$). Amongst the African-derived patients no statistically significant association was observed ($p=0.239$).

When the distribution of CCR5Δ32 was evaluated according to the severity of MS, we observed that patients carrying the CCR5Δ32 variant (n=15) presented a lower EDSS and MSSS (2.83 ± 0.62 and 2.36 ± 0.63) compared to the wild type (n=225; 3.50 ± 0.17 and 3.58 ± 0.20), however this difference was not statistically significant ($p=0.318$ and $p=128$), even when confounder variables were included in the analysis ($p_{adj}=0.809$), or when patients were stratified according to ethnic background or sex.

MS progression index was also considered. CCR5Δ32 was more frequent in patients with a lower PI (n=14; 0.38 ± 0.093) compared to the wild type (n=220; 0.81 ± 0.12), but this difference was not statistically significant ($p=0.356$), neither when corrected by confounders variables sex, ethnic background and age at diagnosis ($p_{adj}=0.418$), nor when patients were stratified according to the ethnic background or sex.

4. Discussion

The present study of the CCR5 Δ 32 allele in a Brazilian cohort of multiple sclerosis evidenced a protective effect of this polymorphism against the development of MS in patients of European ancestry. This finding corroborates previous studies on Spanish, Sicilian, Russian, Brazilian, Danish and Dutch populations [19,20,21,33,34,35]. It is important to point out that, especially when studying the CCR5 Δ 32 polymorphism, it is essential to take into account the ethnic background of the individuals, since it is known that this variant is prevalent in European populations (3-12% among the healthy population) and virtually absent in native African, Asian, and American populations. Actually, it was previously observed a linear trend in CCR5 Δ 32 deletion frequency from north to south Europe, with the highest frequency in the northern European populations [36,37,38,39]. A similar linear trend was described in the Sicilian population, corroborating the hypothesis that CCR5 Δ 32 originally occurred in a northern Caucasian population [40,41]. Although Brazil is composed by a highly admixed population, a report described the MS South-Brazilian patients as mostly of Italian ancestry [42]. In this sense, ethnic/genetic differences could account for the different results found at the literature in the context of the CCR5 Δ 32 deletion and MS. In our study, the lack of association in African-derived individuals could result from this low allelic frequency, which would imply the need of a very large sample. Nevertheless, this same situation, meaning the extreme low frequency of this variant among certain ethnic groups, could account for the lack of association even in studies encompassing relatively large samples. For example, Brassat et al. analyzed 442 Afro-American individuals without revealing any significant association of CCR5 Δ 32 with MS [23]. Still, considering the absence of association, it is important to look carefully to studies where the CCR5 Δ 32 distribution fails to fall under the expected frequencies to HWE [17,18].

When the clinical form and the severity of MS were taken into account, we observed a higher frequency of the CCR5 Δ 32 allele in progressive MS compared to RR-MS among European-derived patients. Moreover, and even if the results did not reach statistical significance, the frequency of the CCR5 Δ 32 variant was slightly higher in less severe MS individuals, an observation which is corroborated by other studies [22,35,43,44,45,46]. For comparison purposes, 50

the Table 4 presents a list of the studies involving the CCR5 Δ 32 allele and MS, highlighting the main results of association.

As previously stated, CCR5 ligand chemokines plays a key role in leucocyte infiltration in CNS [47], and it is known that activated effector CCR5+ T cells exit the lymph nodes and are guided by a gradient of chemokines (including CCL3, CCL4 and CCL5) that are produced by cells such as the microglia, astrocytes and neurons [47,48]. In this context, our data corroborates the idea that a lower signaling through CCR5 could be beneficial, counteracting the development and/or MS progression. The absence of a functional receptor, or the presence of such a receptor at low levels at the cell surface, could impair the adhesion of monocytes and T cells to the brain microvasculature, therefore impairing their pro-inflammatory potential [49,50]. Data from Karam et al. also corroborates this idea, since CCR5 mRNA levels were significantly higher in MS patients compared with the control group [44]. The involvement of the CCR5 Δ 32 allele in inflammatory diseases is undeniable, although depending on the disease context this factor will lead to either protection or susceptibility (see a discussion in Vargas et al. 2009) [51]. Of note, our group already reported an overall protective effect associated to the presence of the CCR5 Δ 32 allele against rheumatoid arthritis susceptibility. This protective effect was evidenced in admixed Brazilian human populations belonging to cities with a low African genetic component [31]. Thus, in accordance with our present results, this highlights the importance of assessing the influence of CCR5 under different genetic backgrounds.

All together, these results suggest CCR5 as a promising target for pharmacological intervention in distinct diseases characterized by CNS inflammation and immune cell activation (as reviewed by Martin-Blondel et al. 2009) [12]. For instance, both TAK779, a synthetic antagonist of CCR5, CXCR3 and CCR2 [52,53] and a fusion protein encoding the second extracellular domain of CCR5 [54] were shown to decrease the severity of experimental autoimmune encephalitis by reducing inflammatory infiltrates in the CNS. Nevertheless, other investigations are needed to clearly delineate the CCR5 functions related to MS and immune cell stimulation in the CNS in order to establish the potential consequences of clinical interventions, once conflicting results among different authors were found (as shown in Table 4).

In conclusion, based in a higher frequency of the *CCR5Δ32* variant among European-derived controls, among P-MS patients (which present a delayed disease onset) and among patients with a less severe disease phenotype, our data points to an important role of the CCR5 molecule in the Central Nervous System inflammation during multiple sclerosis development, possibly by affecting cell migration patterns and by enhancing immune responses. In this sense, our data also corroborates CCR5 as a therapeutic target in MS treatment. Finally, we are recently seeing a series of efforts directed to characterize whole populations in terms of the *CCR5Δ32* variant [61,62,63]. Although mainly intending to impact on transplantation, these studies also highlight the importance of take into account the genetic/ethnic background of the human population in studies of disease susceptibility.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and the São Paulo Research foundation (FAPESP) (grant number: 2015/23345-6), the Brazilian National Council for Research (CNPq) (grant number: 423468/2016-2). A.P. is recipient of a Fellowship from CNPq.

References

[1] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP and Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta analyses. *Lancet Neurol* 2015; 14:263–273.

[2] Pierson E, Simmons SB, Castelli L and Goverman JM. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev.* 2012 ;248(1):205-15.

[3] Kuceyeski AF, Vargas W, Dayan M, Monohan E, Blackwell C, Raj A, Fujimoto K and Gauthier SA. Modeling the relationship among gray matter atrophy, abnormalities in connecting white matter, and cognitive performance in early multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015; 36:702–709.

[4] Perez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintore M, Arrambide G, Nos C, Perkal H, Río J, Edo MC, Horga A, Castelló J, Auger C, Huerga E, Rovira A and Montalban X. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler.* 2013; 19:1878–1886.

[5] Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stuve O, Waubant E and Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014; 83:278–286.

[6] Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2004; 10(Suppl 1): S8–S13. discussion S13–15.

[7] Kurihara T, Warr G, Loy J and Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine.* 1997; 186:1757-1762.

[8] Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C and Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 344–345.

[9] Cruz-Orengo L, Chen YJ, Kim JH, Dorsey D, Song SK and Klein RS. CXCR7 antagonism prevents axonal injury during experimental autoimmune

encephalomyelitis as revealed by in vivo axial diffusivity. *Journal of neuroinflammation*. 2011; 8:170.

[10] Li H, Nourbakhsh B, Cullimore M, Zhang GX and Rostami A. IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. *European journal of immunology*. 2011; 41:2197-2206.

[11] Gu SM, Park MH, Yun HM, Han SB, Oh KW, Son DJ, Yun JS, Hong JT. CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget*. 2016 29;7(13):15382-93.

[12] Martin-Blondel G, Cuzin L, Delobel P, Cuvinciuc V, Dumas H, Alvarez M, Massip P and Marchou B. Is maraviroc beneficial in paradoxical progressive multifocal leukoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome management? *AIDS*. 2009; 23, 2545–2546.

[13] Jokubaitis VG & Butzkueven H. A genetic basis for multiple sclerosis severity: Red herring or real? *Mol Cell Probes*. 2016 30:357-365.

[14] Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, CAYANAN C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP and Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996; 381:667.

[15] Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, Rostamkhani M, Cheng LS, Tourtellotte WW and Cone LA. Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genet Med* 2004; 6:126.

[16] Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hurme M and Elovaara I. Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2003; 108:396.

[17] Pulkkinen K, Luomala M, Kuusisto H, Lehtimäki T, Saarela M, Jalonen TO and Elovaara I. Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004; 109:342.

[18] Shahbazi M, Ebadi H, Fathi D, Roshandel D, Mahamadhoseeni M, Rashidbaghan A, Mohammadi N, MohammadiMahdi MR and Zamani M. CCR5-D 32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29:1205.

[19] Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB, Vittinghoff E, Shih A, Lincoln R, Callier S, Elkins MK, Goodkin DE, Haines JL, Pericak-Vance MA, Hauser SL and Oksenberg JR. CCchemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group. *Immunogenetics* 2000; 51:281.

[20] D'Angelo R, Crisafulli C, Rinaldi C, Ruggeri A, Amato A and Sidoti A. CCR5D32 polymorphism associated with a slower rate disease progression in a cohort of RR-MS sicilian patients. *Mult Scler Int* 2011; 2011:153282.

[21] Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Brum Souza DG, Frota Comini ER, Bobroff F, Morimoto HK, Ehara Watanabe MA, Carvalho De Oliveira J, Matsuo T, Lopes J and Donadi EA. CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. *Int J Mol Med* 2007; 20:337.

[22] van Veen T, Nielsen J, Berkhof J, Barkhof F, Kamphorst W, Bo L, Ravid R, Verweij CL, Huitinga I, Polman CH and Uitdehaag BM. CCL5 and CCR5 genotypes modify clinical, radiological and pathological features of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 190:157.

[23] Brassat D, Motsinger AA, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Barcellos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR and Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction

reveals gene–gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans. *Genes Immun* 2006; 7:310.

[24] Moutsinger AA, Brassat D, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Barcellos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR and Ritchie MD. Complex gene–gene interactions in multiple sclerosis: a multifactorial approach reveals associations with inflammatory genes. *Neurogenetics* 2007; 8:11.

[25] Ristic S, Lovrecic L, Starcevic-Cizmarevic N, Brajenovic-Milic B, Jazbec SS, Barac-Latas V, Vejnović D, Sepčić J, Kapović M and Peterlin B. No association of CCR5D32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. *Mult Scler* 2006; 12:360.

[26] Song GG & Lee YH. A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. *Immunol Invest* 2014; 43:229.

[27] Chies JA & Hutz MH. High frequency of the CCR5delta32 variant among individuals from an admixed Brazilian population with sickle cell anemia. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 71–75.

[28] Kohem CL, Brenol JC, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, de Castilhos Mello A, Cañedo AD, Neves AG and Chies JA. The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 2007; 36: 359–364.

[29] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69:292–302

[30] Lahiri DK & Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFPL studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; 11;19: 5444

[31] Toson B, Dos Santos EJ, Adelino JE, Sandrin-Garcia P, Crovella S, Louzada-Júnior P, Oliveira RD, Pedroza LS, de Fátima Lobato Cunha Sauma M, de Lima CP, Barbosa FB, Brenol CV, Xavier RM, Chies JA, Veit TD. CCR5 Δ 32 and the genetic susceptibility to rheumatoid arthritis in admixed populations: a multicentre study. *Rheumatology (Oxford)*. 2017 1;56(3):495-497.

[32] Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Características étnico-sociais da população: Classificações e identidades, 2 ed. Rio de Janeiro, 2013.

[33] Favorova OO, Andreewski TV, Boiko AN, Sudomoina MA, Alekseenkov AD, Kulakova OG, Slanova AV and Gusev EI. The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians. *Neurology* 2002; 59:1652.

[34] Otaegui D, Ruiz-Martinez J, Olaskoaga J, Emparanza JI and Lopez de Munain A. Influence of CCR5-Delta32 genotype in Spanish population with multiple sclerosis. *Neurogenetics* 2007; 8:201.

[35] Schreiber K, Otura AB, Ryder LP, Madsen HO, Jorgensen OS, Svejgaard A and Sorensen PS. Disease severity in Danish multiple sclerosis patients evaluated by MRI and three genetic markers (HLA-DRB1*1501, CCR5 deletion mutation, apolipoprotein E). *Mult Scler* 2002; 8:295.

[36] Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T. & Clegg, J. Global distribution of the CCR5 gene 32-base pair deletion. *Nature Genetics* 1997 16, 100.

[37] Lucotte, G. & Mercier, G. Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 1998 19, 174.

[38] Battiloro, E., Andreoni, M., Parisi, G., Mura, M.S., Sotgiu, G., Aceti, A., Cossu, G., Concia, E., Verna, R. & D'Ambrosio, E. Distribution of the CCR5 delta 32 allele in Italian HIV type 1-infected and normal individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2000 16, 181.

[39] Papa, A., Papadimitriou, E., Adwan, G., Clewley, J.P., Malissiovas, N., Ntoutsos, I., Alexiou, S. & Antoniadis, A. HIV-1 coreceptor CCR5 and CCR2 mutations among Greeks. *Federation of European Microbiological Societies*. 2000 28, 87.

[40] Sidoti A, D'Angelo R, Rinaldi C, De Luca G, Pino F, Salpietro C, Giunta DE, Saltalamacchia F, Amato A. Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet*. 2005 32(3):193-8.

[41] Libert, F., Cochaux, P., Bechman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinskaskas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics*. 1998 7, 399.

[42] Comini-Frota ER, Brum DG, Kaimen-Maciel DR, Fragoso YD, Barreira AA, Donadi EA. Frequency of reported European ancestry among multiple sclerosis patients from four cities in the southern and southeastern regions of Brazil. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013 115(9):1642-6.

[43] Bien CG, Bauer J, Deckwerth TL, Wiendl H, Deckert M, Wiestler OD, Schramm J, Elger CE and Lassmann H. Destruction of neurons by cytotoxic T

cells: a new pathogenic mechanism in Rasmussen's encephalitis. *Ann. Neurol.* 2002; 51, 311–318.

[44] Karam RA, Rezk NA, Amer MM, Fathy HA. Immune response genes receptors expression and polymorphisms in relation to multiple sclerosis susceptibility and response to INF- β therapy. *IUBMB Life.* 2016; 68 (9):727-34.

[45] Møller M, Søndergaard HB, Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Sellebjerg F, Oturai AB. The chemokine receptor CCR5 Δ 32 allele in natalizumab-treated multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2014;129(1):27-31.

[46] Varadkar S, Bien CG, Kruse CA, Jensen FE, Bauer J, Pardo CA, Vincent A, Mathern GW and Cross JH. Rasmussen's encephalitis: clinical features, pathobiology, and treatment advances. *Lancet Neurol.* 2014; 13, 195–205.

[47] Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, Roberts AD and Woodland DL. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8+ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity.* 2008; 29, 101–113.

[48] Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T and Yamamura T. CCR2+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2012; 189, 5057–5065.

[49] Quandt J. & Dorovini-Zis, K. The β chemokines CCL4 and CCL5 enhance adhesion of specific CD4+ T cell subsets to human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63, 350–362.

[50] Ubogu E E, Callahan M K Tucky B H and Ransohoff R M. CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood–brain barrier in vitro. *Cell. Immunol.* 2006; 243, 19–29.

[51] Vargas AE, Cechim G, Correa JF, Gomes PA, Macedo GS, de Medeiros RM, Perotoni G, Rauber R, Villodre ES, Chies JA. Pros and cons of a missing chemokine receptor--comments on "Is the European spatial distribution of the HIV-1-resistant CCR5-D32 allele formed by a breakdown of the pathocenosis due to the historical Roman expansion?" by Eric Faure and Manuela Royer-Carenzi (2008). *Infect Genet Evol.* 2009; 9(4):387-9.

[52] Ni J, Zhu YN, Zhong XG, Ding Y, Hou LF, Tong XK, Tang W, Ono S, Yang YF and Zuo JP. The chemokine receptor antagonist, TAK- 779, decreased experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing inflammatory cell migration into the central nervous system, without affecting T cell function. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 158, 2046–2056.

[53] Zheng HM, Jiang, Y, Wang, J R, Gong, XL and Guo BY. Mimic peptides bonding specifically with the first and second extracellular loops of the CC chemokine receptor 5 derived from a phage display peptide library are potent inhibitors of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Inflamm. Res.* 2011; 60, 759–767.

[54] Sapir Y, Vitenshtein A, Barsheshet Y, Zohar Y, Wildbaum G and Karin N. A fusion protein encoding the second extracellular domain of CCR5 arrests chemokine-induced cosignaling and effectively suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2010; 185, 2589–2599.

[55] Favorova OO, Favorov AV, Boiko AN, Andreewski TV, Sudomoina MA, Alekseenkov AD, Kulakova OG, Gusev EI, Parmigiani G, Ochs MF. Three allele combinations associated with multiple sclerosis. *BMC Med Genet.* 2006 26;7:63.

[56] Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102:98.

[57] Bennetts BH, Teutsch SM, Buhler MM, Heard RN and Stewart GJ. The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis. *Hum Immunol* 1997; 58:52.

[58] Haase CG, Schmidt S and Faustmann PM. Frequencies of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism and the delta 32 mutation of the chemokine receptor-5 in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett* 2002; 330:293.

[59] Kantarci OH, Morales Y, Ziemer PA, Hebrink DD, Mahad DJ, Atkinson EJ, Achenbach SJ, De Andrade M, Mack M, Ransohoff RM, Lassmann H, Bruck W, Weinshenker BG and Lucchinetti CF. CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 169:137.

[60] Török N, Molnár K, Füvesi J, Karácsony M, Zsiros V, Fejes-Szabó A, Fiatal S, Ádány R, Somogyvári F, Stojiljković O, Vécsei L and Bencsik K. Chemokine receptor V Δ 32 deletion in multiple sclerosis patients in Csongrád County in Hungary and the North-Bácska region in Serbia. *Hum Immunol*. 2015; 76(1): 59-64.

[61] Al Balwi MA, Hadadi AI, Alharbi W, Ballow M, AlAsiri A, AlAbdulrahman A, G K U, Aldrees M, AlAbdulkareem I, Hajeer AH. Analysis of CCR5 gene polymorphisms in 321 healthy Saudis using Next Generation Sequencing. *Hum Immunol*. 2017; 78(4):384-386.

[62] Solloch UV, Lang K, Lange V, Böhme I, Schmidt AH, Sauter J. Frequencies of gene variant CCR5- Δ 32 in 87 countries based on next-generation sequencing of 1.3 million individuals sampled from 3 national DKMS donor centers. *Hum Immunol*. 2017 Nov;78(11-12):710-717.

[63] Enrich E, Vidal F, Sánchez-Gordo F, Gómez-Zumaquero JM, Balas A, Rudilla F, Barea L, Castro A, Larrea L, Perez-Vaquero MA, Prat I, Querol S, Garrido G, Matesanz R, Carreras E, Duarte RF. Analysis of the Spanish CCR5-

Δ 32 inventory of cord blood units: lower cell counts in homozygous donors.
Bone Marrow Transplant. 2018 Feb 6. doi: 10.1038/s41409-018-0114-8.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 1. MS patients clinical and demographic data.

	European derived patients N=166	African derived patients N=74
Mean age (\pm SD)	48.59 (\pm 12.1)	47.96 (\pm 12.1)
Median age (Min-Max)	49.50 (23-82)	46.50 (24-73)
Mean EDSS (\pm SD)	3.23 (\pm 2.6)	3.72 (\pm 2.2)
Median EDSS (Min-Max)	3.00 (0-9)	3.75 (0-9.5)
Mean Age at Diagnosis(\pm SD)	32.33 (\pm 10.7)	32.51 (\pm 10.1)
Median Age at Diagnosis (Min-Max)	32.00 (10-61)	31.00 (10-55)

Abbreviations: \pm SD = Standard Deviation, Min-Max = Minimum-Maximum

Table 2. Genotypic and allelic frequencies in patients and controls

	European derived n (%)		African derived n (%)	
	Patients	Control	Patients	Control
Genotype				
Wt/Wt	155 (93.4)	202 (87.5)	71 (96.0)	194 (97.0)
Wt/ Δ 32	11 (6.6)	31 (11.7)	3 (4.0)	6 (3.0)
Δ 32/ Δ 32	0 (0)	2 (0.8)	0 (0)	0 (0)
P value	0.033		0.706	
OR	0.46		1.38	
Alleles				
Wt	321 (96.7)	435 (92.5)	145 (98.0)	394 (98.5)
Δ 32	11 (3.3)	35 (7.5)	3 (2.0)	6 (1.5)
P value	0.013		0.708	

Abbreviations: Wt/Wt = wild-type homozygous, Wt/ Δ 32 = heterozygous, Δ 32/ Δ 32 = CCR5 Δ 32 homozygous, Wt = wild-type allele, Δ 32 = deletion allele.

Table 3. Distribution of the CCR5 Δ 32 polymorphism in multiple sclerosis patients classified according to the clinical form.

	Wt/Wt (%)		CCR5 Δ 32 (%)		Total	
	Afro	Euro	Afro	Euro	Afro	Euro
RR-MS	24 (90)	76 (96)	3 (10)	3 (4)	27	79
P-MS	26 (100)	58 (90)	0 (0)	6 (10)	26	64
Unknown	21 (100)	21 (90)	0 (0)	3 (10)	21	24

Abbreviations: Wt/Wt = wild-type homozygous, CCR5 Δ 32 = heterozygous + CCR5 Δ 32 homozygous, Wt = wild-type allele, Δ 32 = deletion allele, RR-MS relapse remitting multiple sclerosis; P-MS, progressive multiple sclerosis.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Table 4. Main studies associating CCR5 Δ 32 and Multiple Sclerosis.

Author	Population	N	Controls	Result
Barcellos et al., 2000 * [19]	American (USA)	322	147	age of onset was approximately 3 years later in patients carrying the CCR5 Δ 32 allele
D'Angelo et al., 2011 [20]	Sicilian	180	213	presence CCR5 Δ 32 is associated with slower disease progression (EDSS)
Favorova et al., 2002 ** [33]	Russian	219	354	CCR5 Δ 32 was associated with MS in HLA-DR4-positive patients
Favorova et al., 2006 ** [55]	Russian	286	362	Two-allelic combination associated with MS (CCR5 D32, DRB1*04)
Kaimen-Maciel et al., 2007 [21]	Southern Brazil	124	127	progression to disability may be prolonged in MS carriers of CCR5 Δ 32
Otaegui et al., 2007 [34]	Gipuzkoa (Basque)	62	139	protective role CCR5 Δ 32 against the development of MS
Otaegui et al., 2007 [34]	Gipuzkoa (Otherorigin)	102	210	no significant difference in the allele frequency
Sellebjerg et al., 2000*** [56]	Danish	148	151	Age at onset lower in patients carriers of CCR5 Δ 32 (who have intrathecal synthesis of IgG oligoclonal band)
Schreiber et al., 2002*** [35]	Danish	70	151	no significant difference in the allele frequency, but a less severe progression in CCR5 Δ 32 carriers
van Veen et al., 2007 [22]	DutchCaucasians	637	177	CCR5 Δ 32 was not associated with susceptibility to MS, but associated
with signs of remyelination in brain donors and with onset age of MS in living patients				
Karam et al., 2016 [44]	Egyptian	80	110	no significant difference in the allele frequency, but higher CCR5 mRNA expression in MS patients
Presentstudy	African-derivedbrazilian	74	200	no significant difference in the allele frequency
Presentstudy	European-derivedbrazilian	166	235	protective role CCR5 Δ 32 against the development of MS
Bennetts et al., 1997 [57]	Australian	120	168	no significant difference in the allele frequency
Brassat et al., 2006[23]	African-American (USA)	442	293	no significant difference in the allele frequency
Motsinger et al., 2007 * [24]	non-Hispanic whites of European descent (USA)	421	96	no significant difference in the allele frequency
Haase et al., 2002 [58]	German	253	0	no significant difference in the allele frequency comparing different clinical course
Kantarci et al., 2005 [59]	OlmstedCounty, MN (EUA)	221	0	no significant difference in the allele frequency comparing different clinical course
Ristic et al., 2006 [25]	Croatian	170	356	no significant difference in the allele frequency
Ristic et al., 2006 [25]	Slovenian	155	356	no significant difference in the allele frequency
Møller et al., 2014 [45]	Danish	212	0	no association of CCR5 Δ 32 and relapses in patients treated with natalizumab,
but deletion carriers				

showed lower severity				
<i>Gade-Andavolu et al., 2004 [15]</i>	American (USA)	132	163	CCR5Δ32 was associated with early death
<i>Luomala et al., 2003 [16]</i>	Finland	116	109	CCR5Δ32 was associated with severe MS
<i>Török et al., 2015 [60]</i>	Hungary and Serbia	428	831	no significant difference in the allele frequency
<i>Pulkkinen et al., 2004 [17]</i>	Finland	89	110	CCR5Δ32 may contribute as a risk factor for MS development and predispose individuals to progressive MS
<i>Shahbazi et al., 2009 [18]</i>	Iranian	258	380	CCR5Δ32 polymorphism may be associated with an increased risk of MS

Studies marked with * present overlapping samples

ACCEPTED MANUSCRIPT

CAPÍTULO 4

The glutathione S-transferase T1 deletion in multiple sclerosis patients from Brazil.

(será submetido ao International Journal of Immunogenetics)

The glutathione S-transferase T1 deletion in multiple sclerosis patients from Brazil.

Lian Lopes Troncoso¹, Alessandra Pontillo², Enedina Maria Lobato de Oliveira⁴, Alessandro Finkelsztejn³, Silvete Schneider³, José Artur Bogo Chies^{1*}

¹Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre RS, Brasil.

² Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Imunologia, São Paulo SP, Brasil.

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre RS, Brasil.

⁴Ambulatório de Doenças Desmielinizantes da disciplina de Neurologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo SP, Brasil.

*Corresponding author: Dr. José Artur Bogo Chies. Laboratório de Imunogenética (Prédio 43323, Laboratório 212), Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500, Campus do Vale, Porto Alegre - RS, Brazil, Phone: +5551 33086737. E-mail: jabchies@terra.com.br

Abstract

Background. Multiple sclerosis is an immune-mediated chronic inflammatory disease of the central nervous system that causes demyelination. Reports have identified oxidative tissue injury and oxidized nucleotides, proteins or lipids in multiple sclerosis lesions and oxidative damage is one of early events in MS tissue injury. Also, MS results from the interaction between genetic and environmental factors. The glutathione S-transferases are known as oxidative stress-related genes which code major phase II enzymes involved in the detoxification of xenobiotic substrates and protect cells against reactive oxygen metabolites. In this context, this study aimed to investigate the association of the deletion polymorphism of the *GSTT1* gene with susceptibility to MS and its clinical severity **Patients and Methods.** 246 MS patients and 328 healthy controls were genotyped for *null GSTT1* variant and a case/control analysis was performed. Also, the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) were used to assess the disease severity among patients. **Results and Discussion.** This was the first study to investigate a possible association of this *GSTT1* gene variant with MS in a Brazilian population. Similar genotypic frequencies were observed in MS patients and controls independently of the ethnic origin. Also, similar EDSS and MSSS were observed in patients carrying the *null GSTT1*, when compared to patients with *non-null GSTT1*. **Conclusion.** Our results suggested no association between *GSTT1* and the disease risk and severity in the studied population.

Keywords: Multiple sclerosis, glutathione S-transferases, oxidative damage, *GSTT1*.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that causes demyelination. Although it is established that autoimmunity results from the interaction of genetic and environmental factors, the mechanisms leading to such phenomenon remain not fully understood [1,2]. Importantly, it is known that axonal and neuronal loss begins at the earliest stages of the disease, resulting in cognitive impairment and other early disabilities [3,4].

The International Advisory Committee on clinical trials in MS defines two different MS phenotypes classifying them in relapsing-remitting (RR) MS and progressive MS [5]. RR MS is characterized by discrete episodes of acute neurological deficit and/or worsening of a given neurological function followed by a complete or partial recovery, although progressive MS, which includes secondary progressive (SP) and primary progressive (PP) MS, is characterized by a progressive accumulation of disability from the onset of the disease without identifiable acute relapses [6]. Progressive MS presents a similar prevalence independently of sex, and has a delayed onset as compared to RR MS (by ~10 years) [6]. In contrast, RR MS is the most common MS phenotype (~85% of total cases) and has a female to male prevalence between 2:1 and 3:1 [5].

The glutathione S-transferases (GSTs) are known as oxidative stress-related genes which code major phase II enzymes involved in the detoxification of xenobiotic substrates. These enzymes also protect cells against reactive oxygen metabolites (ROS) due to the conjugation of glutathione with electrophilic compounds, making possible the removal of ROS and the catalysis of reactions in metabolic pathways beyond the detoxification step [7, 8, 9, 10, 11].

In humans, members of the following classes of cytosolic GST are present: *alpha*, *zeta*, *theta*, *mu*, *pi*, *sigma* and *omega* [12]. Two important polymorphic GST genes are those coding for *GSTM1-1* and *GSTT1-1*, mapped on chromosome 1 (1p13.3) and chromosome 22 (22q11.2), respectively [13, 14]. It is known that *GSTM1* is expressed in a variety of tissues such as liver, stomach, brain, and breast while *GSTT1* is mainly expressed in the liver and erythrocytes [17]. Also, the most commonly studied polymorphisms in these

genes, *GSTM1* null and *GSTT1* null alleles are responsible for loss of enzyme function [14, 15, 16,].

Importantly, in multiple sclerosis lesions oxidative tissue injury and oxidized nucleotides, proteins or lipids have already been identified [18, 19, 20], strongly suggesting that oxidative stress plays a key role in development of this condition. Besides, growing evidence suggests that the interplay between genetic and environmental risk factors, such as exposure to sunlight and viral infection, is related with an increased susceptibility to developing MS [21, 22].

In this context, this study aimed to investigate the association of deletion polymorphisms of *GSTT1* gene with the susceptibility to MS and its clinical severity.

2. Methods

2.1 Patients and controls

DNA was obtained from a total of 246 MS patients (men/women: 54/185, 7 patients with no sex information) from the ambulatory of demyelinating diseases, at the Hospital de São Paulo - Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP (São Paulo, SP, Brazil), and at the Neurology Clinic of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), both institutions located in the southern Brazilian region. This group of patients has been previously described [23]. All patients were diagnosed according to McDonald criteria (Revised by Polman, *et al.*, 2011) [24]. The Expanded Disability Status Scale (EDSS) and Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) were used to assess the disease progression [25,26]. Table 1 shows the clinical and demographic data of patients.

The control group was composed by 328 healthy individuals, representing the urban population of this region. The study was approved by the Research Ethics Committee of all involved institutions and informed consent was obtained from all the enrolled individuals. Ethnic origin of all patients and controls was determined based on physical appearance judged by the researcher at the time of blood collection and on data reported by the participants, classifying them as European-derived or African-derived.

2.2 DNA isolation and genotyping *GSTT1*.

The genomic DNA was isolated from 5mL of peripheral blood collected with EDTA by a standard salting-out method [27], and was stored at -20°C. Next, to detect the presence or absence of the *GSTT1* gene in the genomic DNA a multiplex polymerase chain reaction (PCR) method was used to amplify a specific 480pb fragment of the gene, where the absence of this fragment indicates the null genotype. Also, a fragment of the *GSTP1* gene (176pb) was amplified as an internal control in the reaction. All primers used were previously described [16,28,29]. The PCR products were visualized on a 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

2.3 Statistical analysis

Differences in genotype distributions (presence versus absence of the evaluated gene) between the patients and controls were estimated by using the Chi-square test and Fisher's exact test. Adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were used as a measure of the strength and independence of the associations between GST genotypes and MS. The Mann-Whitney test was used to analyze the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) ranks. The statistical analysis was performed using a SPSS software version 22.0.

3. Results

This approach allows the identification of individuals homozygous to the null genotype, being heterozygous and homozygous individuals to the *non-null* allele pooled together. Considering the 246 patients, 56 (22.8%) presented the *null* genotype and 190 (77.2%) had the *non-null* genotype. The control group was composed by 62 (18.9%) individuals with the null genotype and 266 (81.1%) with the *non-null* genotype. The frequency of the *GSTT1 null* genotype was not significantly different in MS patients compared to controls ($p=0.297$).

Since the prevalence of the *GST* gene variants is different in human populations with distinct ethnic backgrounds, we stratified our population according to the ethnic origin as European-derived or African-derived. This classification was performed according to the *Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE* (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) ethnicity classification methods

[30]. 23 patients could not be classified since the absence of information about ethnicity. From the 64 African-derived MS patients, 49 (76.6%) had the *non-null* *GSTT1* genotype and 15 (23.4%) showed the *null* genotype. In the African-derived control group (n=87), 69 (79.3%) had the *non-null* genotype and 18 (20.7%) presented the *null* genotype. No statistically significant difference was found between African-derived patients and the ethnic matched controls (p=0.70). Also, no statistically significant difference was found between the European-derived population (p=0.60), where 126 (79.2%) patients showed the *non-null* *GSTT1* genotype and 33 (20.8%) had the *null* genotype (n=159), and 197 (81.7%) controls had the *non-null* genotype, while 44 (18.3%) had the *null* genotype (n=241). Table 2 shows the *GSTT1* genotypic frequencies in patients and controls.

GSTT1 and the MS clinical onset

GSTT1 null genotype patients presented similar values of MSSS and EDSS (2.81 and 3.0 respectively) when compared to *GSTT1 non-null* genotype patients (3.03 and 3.25 respectively for MSSS and EDSS). No statistically significant difference was observed (p= 0.66 and 0.79, respectively).

The presence of the *GSTT1 null* genotype was also evaluated in association with values after stratification according to ethnicity. No differences were observed concerning the African-derived individuals with the *GSTT1 null* genotype (MSSS and EDSS both 3.8) compared to *non-null* genotype patients (3.7 and 3.8, respectively) (p=0.62 and 0.68). The results obtained for the European-derived sample for *null* genotype patients (MSSS 1.6 and EDSS 2.0) were similar to those for the *non-null* genotype patients (2.3 and 3.0, respectively for MSSS and EDSS), with no statistically significant difference (p=0.96 and 0.56, respectively).

4. Discussion

The importance of stratifying the groups as European-derived and African-derived is based on the different distribution of *GST* gene variants among human populations with distinct ethnic origins. The *GSTT1 null* genotype is relatively common in Asia, reaching frequencies as high as 60%, differently to other populations [31]. For example, several studies reported the *GSTT1 null* genotype prevalence ranging from 13 to 15% in European populations [15,32]. In the USA, the prevalence of this genotype is around 27.6% in European-derived individuals, and 20-24% in African-derived individuals [32,33,34]. Similar to what happens in the North-America African-derived population, data from the literature points to the fact that the African-derived population in Brazil presents a slightly higher prevalence (26.3-28%) of the *null GSTT1* genotype when compared to European-derived (21-22.1%) [35-37]. It is interesting to note that this same trend was observed in the present study.

In this study, we investigated for the first time a possible association of the *GSTT1* gene null variant with MS in a Brazilian population and described similar frequencies in MS patients and controls independently of the ethnic origin. Although it has been suggested that different abilities in the detoxification of oxidative stress products may influence the susceptibility to MS [38-40], there are small number of studies investigating this gene in MS susceptibility and severity, and different results have been found. Actually, the *GSTT1 null* genotype was associated with MS in the Serbian population [41], and an elevated risk, but with no statistical significance was described in to Iranian population [42]. Conversely, no association between the *GSTT1 null* genotype and MS was observed in a Greek population [43]. Interestingly, a meta-analysis associated the *GSTT1 null* genotype with risk of developing multiple sclerosis in Caucasian populations [44], but the authors emphasize that limitations of the study such as the heterogeneity of the analysis and the small number of studies and patients in each study should be taken into consideration.

Considering MS severity, similar EDSS and MSSS were observed in patients carrying the *null GSTT1* genotype when compared to patients with the *non-null GSTT1* genotype, suggesting the absence of an association between these two factors. In this sense, the same study that found association between

the *null GSTT1* genotype and MS in the Serbian population [41] was unable to reveal a statistical significance concerning differences in EDSS and MSSS. Although an association between EDSS and the *null GSTT1* genotype amongst the Iranian MS patients was observed [42], environmental factors and distinct conditions to which the patients could be exposed should be considered, since such factors can influence the antioxidative response, and therefore should be included in further studies.

Concluding, this was the first study investigating the potential effect of the *GSTT1* null genotype and MS in a Brazilian population. Our results suggested no association between *GSTT1* and disease risk or severity in this population, independently of the ethnicity. Due to the small number of studies, more research investigating this feature is needed.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES and the São Paulo Research foundation (FAPESP) (grant number: 2015/23345-6), the Brazilian National Council for Research (CNPq) (grant number: 423468/2016-2). A.P. is recipient of a Fellowship from CNPq.

References

- [1] Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP and Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta analyses. *Lancet Neurol* 2015; 14:263–273.
- [2] Pierson E, Simmons SB, Castelli L and Goverman JM. Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev.* 2012 ;248(1):205-15.
- [3] Kuceyeski AF, Vargas W, Dayan M, Monohan E, Blackwell C, Raj A, Fujimoto K and Gauthier SA. Modeling the relationship among gray matter atrophy, abnormalities in connecting white matter, and cognitive performance in early multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2015; 36:702–709.
- [4] Perez-Miralles F, Sastre-Garriga J, Tintore M, Arrambide G, Nos C, Perkal H, Río J, Edo MC, Horga A, Castelló J, Auger C, Huerga E, Rovira A and Montalban X. Clinical impact of early brain atrophy in clinically isolated syndromes. *Mult Scler.* 2013; 19:1878–1886.
- [5] Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B Jr, Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stuve O, Waubant E and Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology.* 2014; 83:278–286.
- [6] Ebers GC. Natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 2004; 10(Suppl 1): S8–S13. discussion S13–15.
- [7] Hayes JD & Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer

chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 1995 30: 445-600.

[8] Wang T. Glutathione S-transferases variants as risk factors in Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 2015 36(10):1785–1792.

[9] Wilce MCJ, Parker MW. Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1205:1–18.

[10] Sheenan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001;360:1–16.

[11] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45:51–88.

[12] Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug. Metab. Rev.* 43, 138–151 (2011).

[13] Mitrunen, K., Jourenkova N, Kataja V, Eskelinen M, Kosma VM, Benhamou S, Vainio H, Uusitupa M, Hirvonen A. Glutathione S-transferase M1, M3, P1, and T1 genetic polymorphisms and susceptibility to breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2001; 10 (3), 229–236.

[14] Di Pietro, G., Magno, L. A. & Rios-Santos, F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 2010; 6, 153–170.

[15] Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:733–43.

- [16] Pemble S, Schroeder KR, Spencer SR, Meyer DJ, Hallier E, Bolt HM, Ketterer B, Taylor JB. Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J* 1994; 300:271–6.
- [17] Vogl, F.D., Taioli E, Maugard C, Zheng W, Pinto LF, Ambrosone C, Parl FF, Nedelcheva-Kristensen V, Rebbeck TR, Brennan P, Boffetta P.. Glutathione S-transferases M1, T1, and P1 and breast cancer: a pooled analysis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 2004; 13 (9), 1473–1479.
- [18] Vladimirova O, O'Connor J, Cahill A, Alder H, Butunoi C, Kalman B. Oxidative damage to DNA in plaques of MS brains. *Mult Scler* 1998;4:413–8.
- [19] Qin J, Goswami R, Balabanov R, Dawson G. Oxidized phosphatidylcholine is a marker for neuroinflammation in multiple sclerosis brain. *J Neurosci Res* 2007;85:977–84.
- [20] Van Horssen J, Witte ME, Schreiber G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochem Biophys Acta* 1812; 2011:141–50.
- [21] Goldenberg MM Multiple sclerosis review. *Pharmacol Ther* 2012 37(3):175.
- [22] Nicoletti A, Messina S, Bruno E, Mostile G, Quattrocchi G, Raciti L et al Risk factors in multiple sclerosis: a population-based case–control study in Sicily. Background and methods. *Neurol Sci* 2016 37(12):1931–1937.
- [23] Troncoso LL, Pontillo A, Oliveira EML, Finkelsztejn A, Schneider S, Chies JAB. CCR5 Δ 32 - A piece of protection in the inflammatory puzzle of multiple sclerosis susceptibility. *Hum Immunol.* 2018 Aug;79(8):621-626.
- [24] Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker

B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69:292–302.

[25] Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis severity score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144–51.

[26] Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33:1444–52

[27] Lahiri DK & Nurnberger JI Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991; 11;19: 5444.

[28] Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW (1993) Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 85(14):1159–1164.

[29] Rohr P, Veit TD, Scheibel I, Xavier RM, Brenol JC, Chies JA, Kvitko K (2008) GSTT1, GSTM1 and GSTP1 polymorphisms and susceptibility to juvenile idiopathic arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 26(1):151–155.

[30] Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Características étnico-sociais da população: Classificações e identidades, 2 ed. Rio de Janeiro, 2013.

[31] Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslová K, Petrovská H, Vallová B, Drlicková M, Wood SG, Stupáková A, Gasparovic J, Bobek P, Nagyová A, Kováčiková Z, Blazíček P, Liegebil U, Collins AR. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 2001; 482:47-55.

[32] Garte S, Gaspari L & Alexandrie AK. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001 10: 1239-1248.

[33] Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA & Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*, 1996 107: 229-233.

[34] Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M & Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 1995 16: 1243-1245.

[35] Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T: CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 2004;27:133-138.

[36] Gattás GJ, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MA, Bydlowski SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Apr;37(4):451-8. Epub 2004 Mar 23.

[37] Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR and Mara HH. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* 2006 29:613-616.

[38] Ortiz GG, Macias-Islas MA, Pacheco-Moises FP, Cruz-Ramos JA, Sustersik S, Barba EA, et al. Oxidative stress is increased in serum from Mexican patients with relapsing–remitting multiple sclerosis. *Dis Markers* 2009; 26:35–9.

- [39] Hadžović-Džuvo A, Lepara O, Valjevac A, Avdagić N, Hasić S, Kiseljaković E, Ibragić S, Alajbegović A. Serum total antioxidant capacity in patients with multiple sclerosis. *Bosn J Basic Med Sci* 2011;11:33–6.
- [40] Li S, Vana AC, Ribeiro R, Zhang Y. Distinct role of nitric oxide and peroxynitrite in mediating oligodendrocyte toxicity in culture and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroscience* 2011;184:107–19.
- [41] Živković M, Životić I, Dinčić E, Stojković L, Vojinović S, Stanković A. The glutathione S-transferase T1 deletion is associated with susceptibility to multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2013 334(1):6–9.
- [42] Parchami Barjui S, Reisi S, Bayati A. Human glutathione s-transferase enzyme gene variations and risk of multiple sclerosis in Iranian population cohort. *Mult Scler Relat Disord.* 2017 Oct;17:41-46.
- [43] Stavropoulou C1, Korakaki D, Rigana H, Voutsinas G, Polyzoi M, Georgakakos VN, Manola KN, Karageorgiou CE, Sambani C. Glutathione-S- transferase T1 and M1 gene polymorphisms in Greek patients with multiple sclerosis: a pilot study. *Eur J Neurol.* 2007, 14(5):572–574.
- [44] Lee YH, Seo YH, Kim JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Meta-analysis of associations between MTHFR and GST polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurol Sci.* 2015 Nov;36(11):2089-96.

Table 1. MS patients clinical and demographic data.

	Patients N=246
Mean age (\pm SD)	48.21 (\pm 11.97)
Mean EDSS (\pm SD)	3.36 (\pm 2.49)
Mean MSSS (\pm SD)	3.48 (\pm 2.98)
Mean Age at Diagnosis(\pm SD)	32.46 (\pm 10.45)

Abbreviations: \pm SD = Standard Deviation.

Table 2. *GSTT1* genotypic frequencies in patients and controls

Genotype	European derived n (%)		African derived n (%)	
	Patients (n=159)	Control (n=241)	Patients (n=64)	Control (n=87)
<i>Null</i>	33 (20.8)	44 (18.3)	15 (23.4)	18 (20.7)
<i>Non-Null</i>	126 (79.2)	197 (81.7)	49 (76.6)	69 (79.3)
P value	0.60		0.70	
OR	0.853 (CI 95 % 0.51–1.41)		0.852 (CI 95 % 0.39–1.85)	

Abbreviations: OR= Odds Ratio.

CAPÍTULO 5

DISCUSSÕES COMPLEMENTARES E PERSPECTIVAS

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÕES COMPLEMENTARES E PERSPECTIVAS

Discussão Complementar

Mesmo com o elevado número de estudos realizados tentando identificar os diversos fatores que contribuem para o desenvolvimento da Esclerose Múltipla, sua causa permanece desconhecida. Sabe-se que a sua patogênese é determinada por múltiplos fatores, e a perda da tolerância imunológica pode ser influenciada pela interação de fatores genéticos com fatores do ambiente (Compston *et al.*, 2006). A patologia, em geral, é caracterizada pelos infiltrados inflamatórios no sistema nervoso central, ativação da micróglia, proliferação dos astrócitos, danos às bainhas de mielina e níveis variados de degeneração axonal ligados ao estresse oxidativo (Compston e Coles, 2008; Lassmann, 2014; Simons *et al.*, 2014).

Vem sendo ressaltada a importante participação das quimiocinas e seus receptores na imunopatogênese da EM. De forma importante, desde a caracterização da doença, são identificados linfócitos TCD4+ nas lesões, líquido cefalorraquidiano e sangue dos pacientes e o espectro de citocinas e quimiocinas e respectivos receptores coincidem também com a presença destas células (Salveti *et al.*, 1992). Além disso, acredita-se que a expressão de quimiocinas pelos linfócitos T em doenças inflamatórias humanas seja elevada por causa de uma resposta dominada por Th1 ou Th2 inapropriadamente. Células Th1 expressam CXCR3 e CCR5, enquanto Th2 expressam CCR3 e CCR4. Receptores de Quimiocina expressos por células Th1 são considerados importantes na inflamação da EM e na infiltração de linfócitos e monócitos ao SNC.

O alelo *CCR5Δ32* vem sendo um foco de pesquisas, já que altera o quadro de leitura e gera uma proteína truncada, que não é expressa na superfície da célula, obtendo-se o efeito da ausência do receptor (Liu *et al.*, 1996). Estudos mostram que a presença do alelo é capaz de atrasar em até 3,2 anos o início da doença, além de aumentar os intervalos entre as recidivas (Lucotte *et al.*, 1998; Sellebjerg *et al.*, 2000). Em um outro estudo, o alelo *CCR5Δ32* foi associado à morte prematura, possivelmente, por causa do aumento do quadro perfil pró-inflamatório encontrado no microambiente do SNC, que aumentariam os danos aos neurônios e poderia acelerar a neurodegeneração (Gade-Andavolu *et al.*, 2004). Neste contexto, a sinalização reduzida do CCR5 poderia ser um benefício, limitando a adesão de monócitos e linfócitos no SNC, enfraquecendo o potencial inflamatório no

organismo (Quandt e Dorovini-Zis *et al.*, 2004; Ubogu *et al.*, 2006).

O presente trabalho detectou uma associação estatística entre a ausência da EM e a presença do alelo *CCR5Δ32* em euro-descendentes, identificando-o como um fator de proteção contra EM. Além disso, foi observada uma severidade ligeiramente aumentada nos pacientes sem a deleção, corroborando o papel inflamatório do CCR5. Essa diferença não foi estatisticamente comprovada, possivelmente devido ao tamanho amostral. Mesmo assim, este foi o maior estudo associando o alelo *CCR5Δ32* com a EM no Brasil.

No segundo artigo da tese, observamos a ausência de uma associação entre a deleção do alelo *GSTT1* com o risco de desenvolver EM e com a severidade da doença, tais fatores foram verificados pela primeira vez no Brasil. Mesmo não encontrando nenhuma conexão aparente entre os aspectos avaliados, estudos ressaltam que os principais causadores de danos ao SNC durante a EM são macrófagos ativados e micróglia, que produzem danos oxidativos durante a inflamação (Haider *et al.*, 2011; Lassmann e Horssen, 2011), tornando a defesa antioxidante extremamente importante para o quadro da EM. A glutathione S-Transferase compõe a principal defesa antioxidante que restaura o equilíbrio oxidativo (Oliveira *et al.*, 2012; Hayes *et al.*, 2005) e pode ser um importante alvo de pesquisas envolvendo EM, já que o estresse oxidativo pode ser mais prejudicial em indivíduos com o genótipo nulo em comparação com o genótipo selvagem. Além disso, a redução da habilidade de remover espécies reativas e oxigênio pode favorecer a desestabilização da barreira hematoencefálica (Ljubisavljevic *et al.*, 2013; Mitosek-Szewczyk *et al.*, 2010; Calabrese *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2003; Stojanovic *et al.*, 2012; Lochhead *et al.*, 2010).

Perspectivas

Este trabalho abordou o papel do CCR5 na inflamação no SNC durante a esclerose múltipla, os resultados obtidos mostraram que células que expressam o receptor possuem influência direta sobre os danos causados aos neurônios, aumentando a severidade da doença. Dessa forma, bloqueadores de CCR5 devem ser considerados e testados, em pesquisas futuras, como possíveis fármacos para terapias em pacientes que possuem a expressão do receptor. Além disso, como o caráter multifatorial da esclerose múltipla pode

ser uma explicação para os dados conflitantes referentes ao CCR5, cada população pode possuir um grau de influência desse receptor na inflamação do SNC. Por isso, deve-se avaliar a influência do CCR5 na severidade da esclerose múltipla em diferentes populações pelo mundo, com o objetivo de identificar as populações em que a aplicação de um tratamento tendo o CCR5 como alvo seria adequado.

Finalmente, os papéis de elementos capazes de alterar a resposta inflamatória e o equilíbrio oxidativo no SNC devem continuar sendo alvos de exaustiva pesquisa para a busca de possíveis alvos terapêuticos envolvendo esses processos, uma vez que dados sobre a relação das GST com a EM são escassos.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA & Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Letters*, 1996 107: 229-233.
- Abreu P, Mendonça MT, Guimarães J, Sá MJ. Esclerose Múltipla: Epidemiologia, etiopatogenia fisiopatologia e diagnóstico diferencial. *Sinapse*, Lisboa, nov. 2012 v. 12, n. 2, p.5-14.
- Adams CWM. A colour atlas of multiple sclerosis and other myelin disorders. Wolfe Medical Publications, Ipswich, Suffolk, 1989 p.101.
- Agrawal SM, Williamson J, Sharma R, Kebir H, Patel K, Prat A, Yong VW. Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. *Brain* 2013; 136:1760–1777.
- Aktas O., Kieseier B, Hartung HP. Neuroprotection, regeneration and immunomodulation: broadening the therapeutic repertoire in multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 2010, 33:140e52.
- Aliomrani M, Sahraian M, Shirkhanloo H, Sharifzadeh M, Khoshayand MR, Ghahremani MH. Correlation between heavy metal exposure and GSTM1 polymorphism in Iranian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci*. 2017 Jul;38(7):1271-1278.
- Allocati, N., Federici, L., Masulli, M. & Di Ilio, C. Glutathione transferases in bacteria. *FEBS*, 2009 J. 276, 58–75.
- Alves-Leon SV, Malfetano FR, Pimentel ML, Estrada CL, Pereira VC, Liem AM, Novis SA. Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a Brazilian cohort patients. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo jun 2008, v. 66, n. 3-B; p.671-677,.
- Anderson, P.B.; Goodkin, D. Topics in Primary Care Medicine- Current Pharmacology Treatment of Multiple Sclerosis Symptoms. *West J Med*, San Francisco, nov 1996 v. 165, n.1, p. 313-317.
- Ascherio, A.; Munger, K.L. Simon, K.C. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, Philadelphia, nov 2010, v. 9, n.1, p.599-612.
- Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; 464:65-76.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T, Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol*. 2001; 22(3):147–184.
- Balnytė R, Rastenyte D, Vaitkus A, Skrodenienė E, Vitkauskienė A, Ulozienė I. Associations of HLA DRB1 Alleles with Igg Oligoclonal Bands and Their Influence on Multiple Sclerosis Course and Disability Status. *JNN*, Los Angeles, fev.2015 v. 6, n.1, p. 1-5.
- Banisadr G, Rostène W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM. Chemokines and brain functions. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005;4(3):387–399.
- Barcellos LF, Schito AM, Rimmler JB, Vittinghoff E, Shih A, Lincoln R, Callier S, Elkins MK, Goodkin DE, Haines JL, Pericak-Vance MA, Hauser SL and Oksenberg JR. CC chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple

- sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group. *Immunogenetics* 2000; 51:281.
- Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D.. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012; 209:1001–1010.
- Battiloro, E., Andreoni, M., Parisi, G., Mura, M.S., Sotgiu, G., Aceti, A., Cossu, G., Concia, E., Verna, R. & D'Ambrosio, E. Distribution of the CCR5 delta 32 allele in Italian HIV type 1-infected and normal individuals. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 2000 16, 181.
- Belbasis L, Bellou V, Evangelou E, Ioannidis JP, Tzoulaki I. Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta analyses. *Lancet Neurol* 2015; 14:263–273.
- Bendall L. Chemokines and their receptors in disease. *Histol Histopathol*. 2005; 20:907–926.
- Bettencourt A, Martins da Silva A, Pinho E Costa P, Martins Silva B. Moleçuçlar Genetic Studies of Multiple Sclerosis in the Portuguese Population. *Acta Med Port, Cidade do Porto*, 2012 v. 25, n.4, p.224-230.
- Bian B, Zhou LJ, Li L, Lv L, Fan YM. Risk assessment of heavy metals in air, water, vegetables, grains, and related soils irrigated with biogas slurry in Taihu Basin, China. *Environ Sci Pollut Res*, 2015 1–14.
- Binder MD, Fox AD, Merlo D, Johnson L, Giuffrida L, Calvert SE, Akkermann R, Ma GZ, ANZgene, Perera AA, Gresle MM, Laverick L, Foo G, Fabis-Pedrini MJ, Spelman T, Jordan MA, Baxter AG, Foote S, Butzkueven H, Kilpatrick TJ, Field J. 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, mar, 2016, v.12,n.3, p. 1-25.
- Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol* 2014; 128:191–213.
- Bradl M, Lassmann H. Progressive multiple sclerosis. *Sem Immunopathol*, 2009; 31:455–465.
- Brassat D, Motsinger AA, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Cree BA, Barcellos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR and Ritchie MD. Multifactor dimensionality reduction 14 reveals gene–gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans. *Genes Immun* 2006; 7:310.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Bella R, Butterfield DA, Calvani M, Pennisi G, Giuffrida Stella AM. Disruption of thiol homeostasis and nitrosative stress in the cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis: evidence for a protective role of acetylcarnitine. *Neurochem Res* 2003; 28:1321–8.
- Cantorna MT. Vitamin D, and autoimmunity: Is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000, 223: 230–233.

- Cardoso E, Fukuda T, Pereira J, Seixas J, Miranda R, Rodrigues B, Saback T, Andrade R, Cardoso G, Martinez R, Avena J, Melo A. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the state of Bahia, Brasil. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, jun 2006 v. 64, n. 3-B, p. 727-730.
- Cavone L, Peruzzi B, Caporale R, Chiarugi A. Long-term suppression of EAERelapses by pharmacological impairment of epitope spreading. *Br J Pharmacol* 2014; 171:1501–1509.
- Chemaly, D.; Lefrançois, A.; Pérusse, R. Oral and Maxillofacial manifestations of multiple sclerosis. *J. Can. Dent. Assoc, Canadá*, 2000, v. 66, n. 11, p. 600- 605.
- Codarri L, Gyölvézi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B. RORgammat drives production ofthe cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effectorphase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2011; 12:560–567.
- Comini-Frota ER, Brum DG, Kaimen-Maciel DR, Fragoso YD, Barreira AA, Donadi EA. Frequency of reported European ancestry among multiple sclerosis patients from four cities in the southern and southeastern regions of Brazil. *Clin Neurol Neurosurg*. 2013 115(9):1642-6.
- Compston A, Confavreux C, Lassmann H. *McAlpine’s multiple sclerosis*, 2006 4th edn. Churchill Livingstone, London.
- Compston A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002, 359: 1221–1231.
- Compston, A., Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008, 372, 1502–1517.
- Cotton SC, Sharp L, Little J & Brockton N. Glutathione Stransferasepolymorphisms and colorectal cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2000. 151: 7-32.
- Critchley, E. P. Multiple sclerosis initially presenting as facial palsy. *Aviat Space Environ Med, Kirtland*, v.75, n.2, p.1001-1004, nov. 2004.
- D’Angelo R, Crisafulli C, Rinaldi C, Ruggeri A, Amato A and Sidoti A. CCR5D32 polymorphism associated with a slower rate disease progression in a cohort of RR-MS sicilian patients. *Mult Scler Int* 2011; 2011:153282.
- da Gama Pereira A.B., Sampaio Lacativa M.C., da Costa Pereira F.F., Papais Alvarenga R.M. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2015 Nov;4(6):572-9.
- de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, Ke X, Monsuur AJ, Whittaker P, Delgado M, Morrison J, Richardson A, Walsh EC, Gao X, Galver L, Hart J, Hafler DA, Pericak-Vance M, Todd JA, Daly MJ, Trowsdale J, Wijmenga C, Vyse TJ, Beck S, Murray SS, Carrington M, Gregory S, Deloukas P, Rioux JD.. A high-resolution HLAand SNP haplotype map for disease association studies in theextended human MHC. *Nat Genet* 2006; 38: 1166–72.
- De Jager PL (A), Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, Aubin C, Bauer D, Heubach JF, Sandbrink R, Tyblova M, Lelkova P; Steering committee of the BENEFIT study; Steering committee of the BEYOND study; Steering committee of the LTF study; Steering committee of the CCR1 study, Havrdova E, Pohl C,

- Horakova D, Ascherio A, Hafler DA, Karlson EW.. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol* 2009; 8: 1111–19.
- De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R, Romano S; International MS Genetics Consortium, Baranzini SE, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, Gibson RA, Naeglin Y, Uitdehaag B, Matthews PM, Kappos L, Polman C, McArdle WL, Strachan DP, Evans D, Cross AH, Daly MJ, Compston A, Sawcer SJ, Weiner HL, Hauser SL, Hafler DA, Oksenberg JR.. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009. 41: 776–782.
- De Paepe B, Creus KK and De Bleecker JL. Chemokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Front Biosci*, 2008 13:2548–2577.
- Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB* 2001 J 15: 2579–2585.
- Di Pietro, G., Magno, L. A. & Rios-Santos, F. Glutathione S-transferases: an overview in cancer research. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* 2010 6, 153–170.
- Dilthey AT, Moutsianas L, Leslie S, McVean G. HLA*IMP—an integrated framework for imputing classical HLA alleles from SNP genotypes. *Bioinformatics* 2011; 27: 968–72.
- Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2012; 78:823–832.
- Dringen R. Oxidative and antioxidative potential of brain microglial cells. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1223–33.
- Dusinska M, Ficek A, Horska A, Raslová K, Petrovská H, Vallová B, Drlicková M, Wood SG, Stupáková A, Gasparovic J, Bobek P, Nagyová A, Kováčiková Z, Blazíček P, Liegebel U, Collins AR. Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat Res* 2001; 482:47-55.
- Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaldo MV, Young EA, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 2011. 69, 445–454.
- Dyment DA, Herrera BM, Cader MZ, Willer CJ, Lincoln MR, Sadovnick AD, Risch N, Ebers GC. Complex interactions among MHC haplotypes in multiple sclerosis: susceptibility and resistance. *Hum Mol Genet.* 2005 14: 2019–2026.
- Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. *Nature*, 1995. 377: 150–151.
- Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N. Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings. *Lancet*, 2004 363: 1773–1774.
- Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, Boffetta P, Vineis P, Autrup H, Bell DA, Branch RA, Brockmüller J, Daly AK, Heckbert SR, Kalina I,

- Kang D, Katoh T, Lafuente A, Lin HJ, Romkes M, Taylor JA, Rothman N. Pooled analysis and metaanalysis of glutathione S-transferase M1 and bladder cancer: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2002 156: 95-109.
- Farzin L, Amiri M, Shams H, Faghieh MAA, Moassesi ME. Blood levels of lead, cadmium, and mercury in residents of Tehran. *Biol Trace Elem Res*, 2008 123(1–3):14–26.
- Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2002; 42:469–499.
- Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, Mahad D, Bradl M, van Horssen J, Lassmann H. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 2012; 135:886–899.
- Flanagan K1, Fitzgerald K, Baker J, Regnstrom K, Gardai S, Bard F, Mocci S, Seto P, You M, Larochele C, Prat A, Chow S, Li L, Vandeventer C, Zago W, Lorenzana C, Nishioka C, Hoffman J, Botelho R, Willits C, Tanaka K, Johnston J, Yednock T. Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PloS One* 2012. 7:e40443.
- French Research Group on Multiple Sclerosis. Multiple sclerosis in 54 twinships: concordance rate is independent of zygosity. *Ann Neurol*, 1992 32: 724–727.
- Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*, 2014; 10:225–238.
- Gade-Andavolu R, Comings DE, MacMurray J, Rostamkhani M, Cheng LS, Tourtellotte WW and Cone LA. Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis. *Genet Med* 2004; 6:126.
- Gallud L, Bagan JV, Cervelló A, Jiménez Y, Poveda R, Gavalda C. Multiple sclerosis as first manifestation in oral and facial area: presentation of four cases. *Med Oral Cir Bucal*, Valencia, dez. 2006 v.11, n.1, p.141-5.
- Gao CM1, Takezaki T, Wu JZ, Li ZY, Liu YT, Li SP, Ding JH, Su P, Hu X, Xu TL, Sugimura H, Tajima K. Glutathione-S-transferases M1 (GSTM1) and GSTT1 genotype, smoking, consumption of alcohol and tea and risk of esophageal and stomach cancers: a case-control study of a high-incidence area in Jiangsu Province, China. *Cancer Lett*, 2002 188:95-102.
- García, D.R. and Salavirri, L.A.S. Esclerosis múltiple. Revisión bibliográfica. *Rev Cubana Med Integr*, Havana, v. 22, n.2, p. 27-37, ago. 2006.
- Garte S, Gaspari L & Alexandrie AK. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001 10: 1239-1248.
- Gaspar P, Moreira J, Kvitko K, Torres M, Moreira A, Weimer T: CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, GSTP1, and TP53 polymorphisms: do they indicate susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease and non-small-cell lung cancer? *Genetics and Molecular Biology* 2004; 27:133-138
- Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT & Weimer TA. Polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, and TP53

- genes in Amerindians. *American Journal of Physical Anthropology*, 2002 119: 249-256.
- Gattás GJ, Kato M, Soares-Vieira JA, Siraque MS, Kohler P, Gomes L, Rego MA, Bydlowski SP. Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Apr;37(4):451-8. Epub 2004 Mar 23.
- Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM. The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 1997; 120: 1461–83.
- Geisler AS & Olshan AF. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 2001 154: 95-105.
- Ghabaee M, Jabedari B, Al EEN, Ghaffarpour M, Asadi F. Serum and cerebrospinal fluid antioxidant activity and lipid peroxidation in Guillain–Barre syndrome and multiple sclerosis patients. *Int J Neurosci* 2010; 120:301–4
- Gillie O. A new government policy is needed for sunlight and vitamin D. *Br J Dermatol.* 2006, 154: 1052–1061.
- Gonsette RE. Self-tolerance in multiple sclerosis. *Acta Neurol Belgica* 2012; 112:133–140.
- Goodin DS. The genetic basis of multiple sclerosis: a model for MS susceptibility. *BMC Neurol.* 2010. 10: 101.
- Goodin DS1, Reder AT, Ebers GC, Cutter G, Kremenchutzky M, Oger J, Langdon D, Rametta M, Beckmann K, DeSimone TM, Knappertz V.. Survival in MS: a randomized cohort study 21 years after the start of the pivotal IFN β -1b trial. *Neurology.* 2012. 78: 1315–1322.
- Gourraud PA1, McElroy JP, Caillier SJ, Johnson BA, Santaniello A, Hauser SL, Oksenberg JR. Aggregation of multiple sclerosis genetic risk variants in multiple and single case families. *Ann Neurol* 2011; 69: 65–74.
- Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: A vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci.* 2001. 98: 6800–6805.
- Grønlie SA1, Myrvoll E, Hansen G, Grønning M, Mellgren SI. Multiple sclerosis in North Norway, and first appearance in an indigenous population. *J Neurol.* 2000. 247: 129–133.
- 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.
- Grzesiuk, A.K. Epidemiological profile in Multiple Sclerosis patients, Uberaba, MG, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*, São Paulo, v. 69, n.5, p. 852, nov. 2011.
- Guecheva TN and Henriques JAP Metabolismo de Xenobióticos: Citocromo P450. *Genética Toxicológica* 2003: 225-247.
- Haas J, Fritsching B, Trübswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, Vobis D, Krammer

- PH, Suri-Payer E, Wildemann B.. Prevalence of newly generatednaive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function anddetermines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol* 2007;179:1322–1330.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007. 357: 851–862.
- Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Höftberger R, Botond G, Esterbauer H, Binder CJ, Witztum JL, Lassmann H. Oxidativedamage in multiple sclerosis lesions. *Brain* 2011; 134:1914–24.
- Halliwell B. Oxygen radicals, nitric oxide and human inflammatory joint disease. *Ann Rheum Dis*, 1995 54(6):505–510.
- Hartmann FJ, Khademi M, Aram J, Ammann S, Kockum I, Constantinescu C, Gran B, Piehl F, Olsson T, Codarri L, Becher B. Multiple sclerosis-associated IL2RApolymorphism controls GM-CSF production in human TH cells. *Nat Commun.* 2014; 5:5056.
- Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol.* 2003. 49: 277–300.
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U. & Jowsey, I. R. Glutathione transferases. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88 (2005).
- Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer therapy* 2009; 7:254-267.
- Hohlfeld R, Dornmair K, Meinel E, Wekerle H. The search for thetarget antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactiveCD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutictargets. *Lancet Neurol* 2016; 15: 198–209.
- Holick MF. Vitamin D, requirements for humans of all ages: new increased requirements for women and men 50 years and older. *Osteoporos Int* 8 (Suppl 2): 1998 S24–S29.
- Hollembach, J.A.; Okseberg, J.R. The immunogenetics of multiple sclerosis, a comprehensive review. *Jornal of Autoimmunity*, São Francisco, v. 64, n.01, p. 13-25, jul. 2015.
- Honan WP, Heron JR, Foster DH, Snelgar RS.. Paradoxical effects of temperature in multiple sclerosis. *J Neurol, Neurosur and Psych*, London, v.5, n.1, p.1160-1164, jan.1978.
- Horton R, Gibson R, Coghill P, Miretti M, Allcock RJ, Almeida J, Forbes S, Gilbert JG, Halls K, Harrow JL, Hart E, Howe K, Jackson DK, Palmer S, Roberts AN, Sims S, Stewart CA, Traherne JA, Trevanion S, Wilming L, Rogers J, de Jong PJ, Elliott JF, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S. Variation analysis and geneannotation of eight MHC haplotypes: the MHC Haplotype Project.*Immunogenetics* 2008; 60: 1–18.
- Howell OW1, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R.. Meningeal inflammation

- iswidespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 2011; 134:2755–2771.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011 476: 214–219.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 953–62.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. *N Engl J Med* 2007; 357: 851–62.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214–19.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 454–67.
- Islam T1, Gauderman WJ, Cozen W, Hamilton AS, Burnett ME, Mack TM. Differential twin concordance for multiple sclerosis by latitude of birthplace. *Ann Neurol*. 2006. 60: 56–64.
- Isobe N, Keshavan A, Gourraud PA, Zhu AH, Datta E, Schlaeger R, Caillier SJ, Santaniello A, Lizée A, Himmelstein DS, Baranzini SE, Hollenbach J, Cree BA, Hauser SL, Oksenberg JR, Henry RG. 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.
- Jablonski NG and Chaplin G. Skin deep. *Sci Am*. 2002. 287: 74–81.
- Jablonski NG and Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol*. 2000 39: 57–106.
- Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A, Pant MC, BaiqMQ and Mittal B. GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett*. 2006 242:60-67.
- Jersild C, Hansen GS, Svejgaard A, Fog T, Thomsen M, Dupont B. Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* 1973; 302: 1221–25.
- Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 2011, 283(2):65–87.
- Kaimen-Maciel DR, Reiche EM, Brum Souza DG, Frota Comini ER, Bobroff F, Morimoto HK, Ehara Watanabe MA, Carvalho De Oliveira J, Matsuo T, Lopes J and Donadi EA. CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis. *Int J Mol Med* 2007; 20:337.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M. *Principles of Neural Science*, 4th Edn. New

- York, NY:McGraw-Hill Companies, 2000.
- Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2009; 66:390–402.
- 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.
- Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, Cantaert T, Lynch M, Preston-Hurlburt P, Herold KC, Hafler DA, O'Connor KC, Meffre E. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2013; 123:2737–2741.
- Klein RS, Williams KC, Alvarez-Hernandez X, Westmoreland S, Force T, Lackner AA, Luster AD.. Chemokine receptor expression and signaling in macaque and human fetal neurons and astrocytes: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Immunol.* 1999 163, 1636–1646.
- Knudsen LA, Loft SH & Autrup H. Risk assessment: the importance of genetic polymorphisms in man. *Mutation Research*, 2001 483: 83-88.
- Koch-Henderson N. Multiple sclerosis in Scandinavia and Finland. *Acta Neurol Scand.* 1995 161: 55–59.
- Kohem CL, Chies JAB and Brenol JCT. Estudo do polimorfismo e expressão do CCR5 em pacientes com artrite reumatóide. Tese de doutorado, (2005) UFRGS.
- Koizumi K, Hojo S, Akashi T, Yasumoto K and Saiki I. Chemokine receptors in cancer metastasis and cancer cell-derived chemokines in host immune response. *Cancer Sci.* 2007. 98(11):1652-8.
- Kotter MR, Li WW, Zhao C, Franklin RJ. Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* 2006; 26:328–332.
- Kurihara T, Warr G, Loy J and Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *The Journal of experimental medicine.* 1997; 186:1757-1762.
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2705–12.
- Kvitko K, Gaspar PA, Torres MR and Mara HH. CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in an Afro-Brazilian group. *Genetics and Molecular Biology* 2006 29:613-616.
- Larochelle C, Cayrol R, Kebir H, Alvarez JI, Lécuyer MA, Ifergan I, Viel É, Bourbonnière L, Beauseigle D, Terouz S, Hachehouche L, Gendron S, Poirier J, Jobin C, Duquette P, Flanagan K, Yednock T, Arbour N, Prat A. Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 2012; 135: 2906–2924.
- Lassmann H & van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585:3715–23.
- Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and

- pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8:647–656.
- Lassmann H. Multiple sclerosis: lessons from molecular neuropathology. *Exp Neurol*. 2014; 262 (Pt A):2–7.
- Lee-Chang C1, Zéphir H, Top I, Dubucquoi S, Trauet J, Prin L, Vermersch P. B-cell subsets up-regulate alpha4 integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis onset. *Neurosci Lett* 2011; 487:273–277.
- Leslie S, Donnelly P, McVean G. A statistical method for predicting classical HLA alleles from SNP data. *Am J Hum Genet* 2008;82: 48–56.
- Li, Y. S., Hung, S. C., Wei, Y. H. & Tarnag, D. C. GST M1 polymorphism associates with DNA oxidative damage and mortality among hemodialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 20, 405–415 (2009).
- Libert, F., Cochaux, P., Bechman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics*. 1998 7, 399.
- Libert, F., Cochaux, P., Bechman, G., Samson, M., Aksenova, M., Cao, A., Czeizel, A., Claustres, M., de la Rua, C., Ferrari, M., Ferrec C, Glover G, Grinde B, Güran S, Kucinkas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G. The delta CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Human Molecular Genetics*. 1998 7, 399.
- Lips P. Vitamin D, physiology. *Prog Biophys Mol Biol*. 2006 92: 4–8.
- Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol* 2012; 246:85–95.
- Lisak, R.P.; Levinson, A.I.; Zweiman, B.; Abdou, N.I. T and β lymphocytes in multiple sclerosis. *Clin. Exp Immunol*, Pennsylvania, v. 22, n.2, p.30-34, jan. 1975.
- Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA and Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*. 1996 86(3):367-77.
- Ljubisavljevic S, Stojanovic I, Vojinovic S, Stojanov D, Stojanovic S, Cvetkovic T. The patients with clinically isolated syndrome and relapsing remitting multiple sclerosis show different levels of advanced protein oxidation products and total thiol content in sera and csf. *Neurochem Int.* neuint.2013.02.025
- Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, DeMarco KM, Nametz N, Davis TP. Oxidative stress increases blood–brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30: 1625–36.

- Lucas M, Rodríguez MC, Gata JM, Zayas MD, Solano F, Izquierdo G. Regulation by interferon beta-1a of reactive oxygen metabolites production by lymphocytes and monocytes and serum sulfhydryls in relapsing multiple sclerosis patients. *Neurochem Int* 2003; 42:67–71.
- Lucotte, G. & Mercier, G. Distribution of the CCR5 gene 32-bp deletion in Europe. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 1998 19, 174.
- Luomala M, Lehtimäki T, Huhtala H, Ukkonen M, Koivula T, Hurme M and Elovaara I. Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2003; 108:396.
- Maglich JM, Stoltz CM, Goodwin B, Hawkins-Brown D, Moore JT, Kliewer SA. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification. *Mol Pharmacol* 2002 ;62:638-46.
- Magliozzi R1, Howell OW, Reeves C, Roncaroli F, Nicholas R, Serafini B, Aloisi F, Reynolds R. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68:477–493.
- Mahad DJ, Howell SJ, Woodroffe MN. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002; 72(4):498–502.
- Mañes S, Mira E, Colomer R, Montero S, Real LM, Gómez-Moutón C, Jiménez-Baranda S, Garzón A, Lacalle RA, Harshman K, Ruíz A and Martínez-A C. CCR5 expression influences the progression of human breast cancer in a p53-dependent manner. *J Exp Med*. 2003. 198:1381–1389.
- Marques CD, Dantas AT, Fragoso TS, Duarte AL.. A importância dos níveis de vitamina D nas doenças autoimunes. *Rev Bras Reumatol, Recife*, v. 50 n.1, p.67-80, nov. 2010.
- Martinson, J.J., Chapman, N.H., Rees, D.C., Liu, Y.T. & Clegg, J. Global distribution of the CCR5 gene 32-base pair deletion. *Nature Genetics* 1997 16, 100. 16
- Mazur G, Jaskuła E, Kryczek I, Dłubek D, Butrym A, Wróbel T, Lange A, Kuliczowski K.. Proinflammatory chemokine gene expression influences survival of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Folia Histochem Cytobiol*. 2011; 49(2):240–247.
- Melief J, Schuurman KG, van de Garde MD, Smolders J, van Eijk M, Hamann J, Huitinga I.. Microglia in normal appearing white matter of multiple sclerosis are alerted but immunosuppressed. *Glia* 2013; 61:1848–1861.
- Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Bushell TJ, Gray PW, Miller RJ.. Chemokines regulate hippocampal neuronal signaling and gp120 neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 14500–14505 (1998).
- Miller E, Mrowicka M, Malinowska K, Zolynski K, Kedziora J. Effects of the whole body cryotherapy on a total antioxidative status and activities of some antioxidative enzymes in blood of patients with multiple sclerosis—preliminary study. *J Med Invest* 2010; 57:168–73.
- Miller E, Mrowicka M, Saluk-Juszczak J, Ireneusz M. The level of isoprostanes as a non-

- invasive marker for in vivo lipid peroxidation in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurochem Res* 2011; 36:1012–6.
- Mindur JE, Ito N, Dhib-Jalbut S, Ito K. Early treatment with anti-VLA-4 mAb can prevent the infiltration and/or development of pathogenic CD11b β CD4 β T cells in the CNS during progressive EAE. *PLoS one* 2014; 9: e99068.
- Mitosek-Szewczyk K, Gordon-Krajcer W, Walendzik P, Stelmasiak Z. Free radical peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis after glucocorticoid therapy. *Folia Neuropathol* 2010;48:116–22.
- Molnarfi NI, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, Shetty A, Linington C, Slavina AJ, Hidalgo J, Jenne DE, Wekerle H, Sobel RA, Bernard CC, Shlomchik MJ, Zamvil SS. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* 2013; 210:2921–2937.
- Montalban X, Tintoré M, Swanton J, Barkhof F, Fazekas F, Filippi M, Frederiksen J, Kappos L, Palace J, Polman C, Rovaris M, de Stefano N, Thompson A, Yousry T, Rovira A, Miller DH. MRI criteria for MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology* 2010; 74:427–434.
- Moreira MA, Souza AL, Lana-Peixoto MA, Teixeira MM, Teixeira 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. 2006.
- Motsinger AA, Brassat D, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K, Steiner LL, Barcellos LF, Pericak-Vance MA, Schmidt S, Gregory S, Hauser SL, Haines JL, Oksenberg JR and Ritchie MD. Complex gene–gene interactions in multiple sclerosis: a multifactorial approach reveals associations with inflammatory genes. *Neurogenetics* 2007; 8:11.
- Müller M, Carter S, Hofer MJ, Campbell IL. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in neuroimmunity – a tale of conflict and conundrum. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2010;36(5):368–387.
- Mumford CJ, Wood NW, Kellar-Wood H, Thorpe JW, Miller DH, Compston DA. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. *Neurology* . 1994 44: 11–15.
- Naegele M, Tillack K, Reinhardt S, Schippling S, Martin R, Sospedra M. Neutrophils in multiple sclerosis are characterized by a primed phenotype. *J Neuroimmunol* 2012; 242:60–71.
- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005. 26: 662–687.
- Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HLA-A3. *Tissue Antigens* 1972; 2: 1–4.
- Nelson HH, Wiencke JK, Christiani DC, Cheng TJ, Zuo ZF, Schwartz BS, Lee BK, Spitz MR, Wang M & Xu X. Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 1995 16: 1243-1245

- Ni J1, Zhu YN, Zhong XG, Ding Y, Hou LF, Tong XK, Tang W, Ono S, Yang YF, Zuo JP. The chemokine receptor antagonist, TAK-779, decreased experimental autoimmune encephalomyelitis by reducing inflammatory cell migration into the central nervous system, without affecting T cell function. *Br. J. Pharmacol.* 158,2046–2056 (2009).
- Nielsen NM1, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, Koch-Henriksen N, Melbye M. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol.* 2005 Oct 15;162(8):774-8.
- Nielsen NM1, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, Koch-Henriksen N, Melbye M. Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study. *Am J Epidemiol.* 2005 162: 774–778.
- Noster R, Riedel R, Mashreghi MF, Radbruch H, Harms L, Haftmann C, Chang HD, Radbruch A, Zielinski CE. IL-17 and GM-CSF expression are antagonistically regulated by human T helper cells. *Sci Transl Med* 2014; 6:241ra280.
- Oakley, A. Glutathione transferases: a structural perspective. *Drug. Metab. Rev.* 43, 138–151 (2011).
- Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991;38: 1–15.
- Oliveira SR, Kallaur AP, Simao ANC, Morimoto HK, Lopes J, Panis C, et al. Oxidative stress in multiple sclerosis patients in clinical remission: association with the expanded disability status scale. *J Neurol Sci* 2012;321:49–53.
- Papa, A., Papadimitriou, E., Adwan, G., Clewley, J.P., Malissiovas, N., Ntoutsos, I., Alexiou, S. & Antoniadis, A. HIV-1 coreceptor CCR5 and CCR2 mutations among Greeks. *Federation of European Microbiological Societies.* 2000 28, 87.
- 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.
- 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.
- Park MH1, Lee YK, Lee YH, Kim YB, Yun YW, Nam SY, Hwang SJ, Han SB, Kim SU, Hong JT. Chemokines released from astrocytes promote chemokine receptor 5-mediated neuronal cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 315, 2715–2726 (2009).
- Patrick L. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev: a J of Clin Ther*, 2006, 11(2):114–127.
- Patsopoulos N, Baranzini SE, Santaniello A, *et al.* The Multiple Sclerosis Genomic Map: Role of peripheral immune cells and resident microglia in susceptibility. *BioRxiv* 2017; published online July 13.
- Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, Raj T; IMISGC; ANZgene, Gourraud PA, Stranger BE, Oksenberg J, Olsson T, Taylor BV, Sawcer S, Hafler DA, Carrington M, De Jager PL, de Bakker PI. Fine-mapping

- the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003926.
- Peferoen L1, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia crosstalk in the central nervous system. *Immunology* 2014; 141:302–313.
- Peixoto L., 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.
- Peterson, J. W., Bö, L., Mörk, S., Chang, A. & Trapp, B. D. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* 50,389–400 (2001).
- Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL. Myelin recovery in multiplesclerosis: the challenge of remyelination. *Brain Sci* 2013; 3:1282–1324.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinschenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiplesclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011; 69:292–302.
- Polman, C.H.; Uitdehaag, B. M. Drug treatment of multiple sclerosis. *JBM*, Amsterdam, v. 321, n.1, p.19-26, ago. 2000.
- Pulkkinen K, Luomala M, Kuusisto H, Lehtimäki T, Saarela M, Jalonen TO and Elovaara I. Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004; 109:342.
- Quandt J. & Dorovini-Zis, K. The β chemokines CCL4 and CCL5 enhance adhesion of specific CD4+ T cell subsets to human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63, 350–362.
- Ramagopalan SV, Morris AP, Dymant DA, Herrera BM, DeLuca GC, Lincoln MR, Orton SM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC.. The Inheritance of Resistance Alleles in Multiple Sclerosis. *Plos Genetics*, UK, v. 3, n.9, p.1607-1613, set. 2007.
- Rebbeck TR. Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1997 6: 733-743.
- Reboldi A1, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 2009; 10:514–523.
- Reszka E & Wasowicz W. Significance of genetic polymorphisms in glutathione S-transferase multigene family and lung cancer risk. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, (2001) 14: 99-113.
- Ristic S, Lovrecic L, Starcevic-Cizmarevic N, Brajenovic-Milic B, Jazbec SS, Barac-Latas V, Vejnović D, Sepčić J, Kapović M and Peterlin B. No association of CCR5D32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients. *Mult Scler* 2006; 12:360.

- Ristori G, Cannoni S, Stazi MA, Vanacore N, Cotichini R, Alfò M, Pugliatti M, Sotgiu S, Solaro C, Bomprezzi R, Di Giovanni S, Figà Talamanca L, Nisticò L, Fagnani C, Neale MC, Cascino I, Giorgi G, Battaglia MA, Buttinelli C, Tosi R, Salvetti M.. Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study. *Ann Neurol*. 2006. 59: 27–34.
- Robertson NP1, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain*. 1996. 119: 449–455.
- Rolla S, Bardina V, De Mercanti S, Quaglino P, De Palma R, Gned D, Brusa D, Durelli L, Novelli F, Clerico M. Th22 cells are expanded in multiplesclerosis and are resistant to IFN-beta. *J Leukocyte Biol* 2014; 96:1155–1164.
- Romme Christensen J, Börnsen L, Ratzer R, Piehl F, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS, Sellebjerg F. Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression. *PloS One* 2013; 8:e57820.
- Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001 22: 117–139.
- Rothhammer V, Heink S, Petermann F, Srivastava R, Claussen MC, Hemmer B, Korn T. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE. *J Exp Med* 2011; 208:2465–2476.
- Rottman JB1, Ganley KP, Williams K, Wu L, Mackay CR, Ringler DJ. Cellular localization of the chemokine receptor CCR5. Correlation to cellular targets of HIV-1 infection. *Am. J. Pathol* (1997). 151,1341–1351
- Rovaris M, Confavreux C, Furlan R, Kappos L, Comi G, Filippi M. Secondary progressive multiple sclerosis: current knowledge and future challenges. *Lancet Neurol* 2006; 5:343–354.
- Rovira A1, Swanton J, Tintoré M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, Frederiksen JL, Langkilde A, Miszkiel K, Polman C, Rovaris M, Sastre-Garriga J, Miller D, Montalban X. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009 ;66:587–592.
- Roy B, Majumder PP, Dey B, Chakraborty M, Banerjee S, Roy M, Mukherjee N & Sil SK. Ethnic differences in distributions of GSTM1 and GSTT1 homozygous “null” genotypes in India. *Human Biology*, 2001. 73: 443-450.
- Rubio JP1, Bahlo M, Butzkueven H, van Der Mei IA, Sale MM, Dickinson JL, Groom P, Johnson LJ, Simmons RD, Tait B, Varney M, Taylor B, Dwyer T, Williamson R, Gough NM, Kilpatrick TJ, Speed TP, Foote SJ. Genetic dissection of the human leukocyte antigen region by use of haplotypes of Tasmanians with multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1125–37.
- Sadovnick AD1, Ebers GC, Dyment DA, Risch NJ. Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. *Lancet*. 1996. 347: 1728–1730.
- Salveti M, Massacesi L. Experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis: immunoregulatory mechanisms and T cell repertoires. *Cell Immunol*. 1992

- Jun;142(1):217-9.
- Sand IK, Krieger S, Farrell C, Miller AE. Diagnostic uncertainty during the transition to secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20:1654–1657.
- Sapir Y, Vitenshtein A, Barsheshet Y, Zohar Y, Wildbaum G, Karin N. A fusion protein encoding the second extracellular domain of CCR5 arrests chemokine-induced co-signaling and effectively suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 2010. 185, 2589–2599.
- Sato W, Tomita A, Ichikawa D, Lin Y, Kishida H, Miyake S, Ogawa M, Okamoto T, Murata M, Kuroiwa Y, Aranami T, Yamamura T. CCR2+CCR5+ T cells produce matrix metalloproteinase-9 and osteopontin in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2012. 189, 5057–5065.
- Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 2014; 13:700–709.
- Sawcer, S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain Advance*, Cambridge, v. 1, n.1, p. 1-28, maio. 2008.
- Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. *FEBS Lett* 2011; 585:3758–3763.
- Schirmer L, Srivastava R, Hemmer B. To look for a needle in a haystack: the search for autoantibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20: 271–79.
- Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Böning D, Breuer J, Kuhlmann T, Gross CC, Flanagan K, Sorokin L, Vestweber D, Zarbock A, Schwab N, Wiendl H. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med* 2014; 211:1833–1846.
- Schwarz A, Schumacher M, Pfaff D, Schumacher K, Jarius S, Balint B, Wiendl H, Haas J, Wildemann B. Fine-tuning of regulatory T cell function: the role of calcium signals and naive regulatory T cells for regulatory T cell deficiency in multiple sclerosis. *J Immunol* 2013; 190:4965–4970.
- Sellebjerg F, Madsen HO, Jensen CV, Jensen J, Garred P. CCR5 delta 32, matrix metalloproteinase 9 and disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2000; 102:98–106.
- Selter RC, Hemmer B. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. *ImmunoTargets Ther* 2013; 2:21–30.
- Shahbazi M, Ebadi H, Fathi D, Roshandel D, Mahamadhoseeni M, Rashidbaghan A, Mohammadi N, MohammadiMahdi MR and Zamani M. CCR5- D 32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population. *Cell Mol Neurobiol* 2009; 29:1205.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16 (2001).
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M. & Dowd, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16 (2001).

- Sheng W, Yang F, Zhou Y, Yang H, Low PY, Kemeny DM, Tan P, Moh A, Kaplan MH, Zhang Y, Fu XY. STAT5 programs a distinct subset of GM-CSF-producing T helper cells that is essential for autoimmune neuroinflammation. *Cell Res* 2014; 24:1387–1402.
- Sidoti A, D'Angelo R, Rinaldi C, De Luca G, Pino F, Salpietro C, Giunta DE, Saltalamacchia F, Amato A. Distribution of the mutated delta 32 allele of the CCR5 gene in a Sicilian population. *Int J Immunogenet.* 2005 32(3):193-8.
- Silva AM, Pereira C, Bettencourt A, Carvalho C, Couto AR, Leite MI, Marta M, Freijo M, Costa PP, Mendonça D, Monteiro L, Armas JB, Martins B. 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.
- Silva KR, Alvarenga RM, Fernandez Y, Fernandez O, Alvarenga H, Thuler LC. 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.
- Simons M, Misgeld T, Kerschensteiner M. A unified cell biological perspective on axon-myelin injury. *J Cell Biol.* 2014; 206:335–345.
- Sinclair H. Polyunsaturated fatty acids in multiple sclerosis. *Br Med.* 1977 J 2: 1217.
- Singh S1, Metz I, Amor S, van der Valk P, Stadelmann C, Brück W. Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta Neuropathol* 2013; 125:595–608.
- Song GG & Lee YH. A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility. *Immunol Invest* 2014; 43:229.
- Sorce S, Myburgh R, Krause KH. The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. *Prog Neurobiol.* 2011;93(2):297–311.
- Steinman L. Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:257–281.
- Stojanovic I1, Vojinovic S, Ljubisavljevic S, Pavlovic R, Basic J, Pavlovic D, Ilic A, Cvetkovic T, Stukalov M. INF- β 1b therapy modulates L-arginine and nitric oxide metabolism in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2012 Dec 15;323(1-2):187-92.
- Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S and Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001 482:21-26.
- Swanton JK1, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Hueriga E, Miszkiel KA, Plant GT, Polman C, Rovaris M, Thompson AJ, Montalban X, Miller DH. MRI criteria for multiple sclerosis inpatients presenting with clinically isolated syndromes: A multicentre retrospective study. *Lancet Neurol* 2007; 6:677–686.
- Tavera-Mendoza LE, White JH. Cell defenses and the sunshine vitamin. *Sci Am.* 2007 297: 62–65, 68-70, 72.
- 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.
- Trebst C, Sørensen TL, Kivisäkk P, Cathcart MK, Hesselgesser J, Horuk R, Sellebjerg F,

- Lassmann H, Ransohoff RM.. CCR1+/CCR5+ mononuclearphagocytes accumulate in the central nervous systemof patients with multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 2001, 159,1701–1710.
- Tur C1, Tintoré M, Rovira A, Nos C, Ríó J, Téllez N, Galán I, Perkal H, Comabella M, Sastre-Garriga J, Montalban X. Very early scans for demonstrating disseminationin time in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 14:631–635.
- Ubogu E E, Callahan M K Tucky B H and Ransohoff R M. CCR5 expression on monocytes and T cells: modulation by transmigration across the blood–brain barrier in vitro. *Cell. Immunol.* 2006; 243, 19–29
- Usatyuk PV, Natarajan V. Hydroxyalkenals and oxidized phospholipids modulation of endothelial cytoskeleton, focal adhesion and adherens junction proteins in regulating endothelial barrier function. *Microvasc Res* 2012; 83:45–55.
- van Horssen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, Gerritsen W, Kooi EJ, Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, Peferoen-Baert R, van den Elsen PJ, van der Valk P, Amor S. Clusters of activated microglia innormal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J Neuroinflamm* 2012; 9:156.
- van Horssen J, Witte ME, Schreiber G, de Vries HE. Radical changes in multiplesclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:141–50.
- van Veen T, Nielsen J, Berkhof J, Barkhof F, Kamphorst W, Bo L, Ravid R, Verweij CL, Huitinga I, Polman CH and Uitdehaag BM. CCL5 and CCR5 genotypes modify clinical, radiological and pathological features of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2007; 190:157.
- Vargas AE, Marrero AR, Salzano FM, Bortolini MC and Chies JAB. Frequency of CCR5delta32 in Brazilian populations. *Braz J Med Biol Res.* 2006, 39:321-325.
- Vignali DA, Collison LW and Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008, 8:523-532.
- Virley, D.J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. *Neuro Rx*, London, v. 2, n.4, p. 638-649, out. 2005.
- Wang Y, Spitz MR, Schabath MB, Ali-Osman F, Mata H and Wu X. Association between glutathione S-transferase p1 polymorphisms and lung cancer risk in Caucasians: a case-control study. *Lung Cancer.* 2003, 40:25-32.
- Wegner, C., Esiri, M. M., Chance, S. A., Palace, J. & Matthews, P. M. Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology.* 2006, 67, 960–967.
- Westmoreland SV1, Alvarez X, deBakker C, Aye P, Wilson ML, Williams KC, Lackner AA. Developmental expression patterns of CCR5 and CXCR4 in the rhesus macaque brain. *J. Neuroimmunol.* 2002, 122, 146–158.
- White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev.* 2013 Jan 8;65(1):47-89.
- Wilkinson Jt & Clapper ML. Detoxication enzymes andchemoprevention. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997, 216:192-200.

- Willer CJ1, Dymment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC; Canadian Collaborative Study Group. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100: 12877–12882.
- Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis* 2010; 2011:164608.
- Wojkowska DW, Szpakowski P, Ksiazek-Winiarek D, Leszczynski M, Glabinski A. Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2014 590409.
- Wu, B. & Dong, D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012. 33, 656–668.
- Xia MQ, Bacskai BJ, Knowles RB, Qin SX, Hyman BT. Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: In vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*. 2000; 108(1–2):227–235.
- Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* 2005; 28:249-68.
- Yadav SK1, Mindur JE, Ito K, Dhib-Jalbut S. Advances in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2015 Jun;28(3):206-19.
- Zabel BA, Zuniga L, Ohshima T, Allen SJ, Cichy J, Handel TM and Butcher EC. Chemoattractants, extracellular proteases, the integrated host defense response. *Exp Hematol*. 2006, 34:1021–1032.
- Zheng, H. M., Jiang, Y., Wang, J. R., Gong, X. L. & Guo, B. Y. Mimic peptides bonding specifically with the first and second extracellular loops of the CC chemokine receptor 5 derived from a phage display peptide library are potent inhibitors of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Inflamm. Res*. 2011, 60,759–767.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000; 12(2):121–127.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PACIENTES

Nº do projeto GPPG ou CAAE _____

Título do Projeto: Aspectos da imunidade inata em pacientes com esclerose múltipla.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar características do sistema de defesa que estão relacionadas a Esclerose Múltipla. Para isso, vamos analisar seu DNA (molécula que contém as todas informações do organismo) e algumas células do sistema de defesa do seu corpo (Células Dendríticas), além de citocinas (moléculas que participam no sistema de defesa do corpo). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS em colaboração com o setor da Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: sua permissão para consultarmos seu prontuário médico e sua permissão para a coleta de 20 mL de seu sangue. Além disso, você responderá um questionário com duração máxima de dez minutos, correspondente a 23 perguntas sobre seu cotidiano e seus sintomas.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são hematoma e dor causado pela agulha após a coleta de sangue, além de dedicar no máximo dez minutos da sua atenção ao questionário sobre seu cotidiano. Não são conhecidos riscos para a coleta de 20 mL de sangue.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o conhecimento de novos fatores genéticos e imunológicos que são importantes no surgimento e progressão da Esclerose Múltipla e poderão ajudar na descoberta de futuros tratamentos. O projeto não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem

a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável (professor José Artur Bogo Chies), pelo telefone (051) 3308-6740, com o pesquisador MSC Lian Lopes Troncoso, pelo telefone (051) 82591035, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO GRUPO CONTROLE

Nº do projeto GPPG ou CAAE _____

Título do Projeto: Aspectos da imunidade inata em pacientes com esclerose múltipla.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar características do sistema de defesa que estão relacionadas a Esclerose Múltipla. Para isso, vamos analisar seu DNA (molécula que contém as todas informações do organismo) e algumas células do sistema de defesa do seu corpo (Células Dendríticas), além de citocinas (moléculas que participam no sistema de defesa do corpo). Como você não possui o diagnóstico de Esclerose Múltipla, sua participação será como grupo controle. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da UFRGS em colaboração com o setor da Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: sua permissão para a coleta de 20 mL de seu sangue. Além disso, você responderá um questionário com duração máxima de dez minutos.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são hematoma e dor causado pela agulha após a coleta de sangue, além de dedicar no máximo dez minutos da sua atenção ao questionário sobre seu cotidiano. Não são conhecidos riscos para a coleta de 20 mL de sangue.

O projeto não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o conhecimento de novos fatores genéticos e imunológicos que são importantes no surgimento e progressão da Esclerose Múltipla, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, porém, poderá ser ressarcido por despesas decorrentes de sua participação, cujos custos serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem

a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável (professor José Artur Bogo Chies), pelo telefone (051) 3308-6740, com o pesquisador MSC Lian Lopes Troncoso, pelo telefone (051) 82591035, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO III

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

PACIENTE **REGISTRO HCPA:** _____

1. Nome: _____

2. Endereço: _____

3. Bairro: _____ Cidade: _____

4. CEP: _____

5. Fone casa: _____ Fone Cel: _____

6. Data nascimento: _____ Idade: _____

7. Profissão/ocup: _____

8. Escolaridade: _____

9. Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

11. Grupo Sanguíneo: _____ Fator RH: () positivo () negativo () não sabe

12. Fumo: () Sim () Não Média de cigarros por dia: _____

13. Álcool: () Sim () Não Frequência: _____

14. Outras drogas: () Sim () Não Qual: _____

15. Evolução da doença: ()EM-RR ()EM-PP () EM-SP

16. Informe quais os sintomas:

17. Data de Início dos sintomas: _____

18. Data do Diagnóstico: _____

19. Tratamento para Esclerose Múltipla (atualmente em uso): _____

20. Outros medicamentos em uso: _____

21. Outras co-morbidades (doenças) crônicas: _____

22. Escala de EDSS atual: _____

23. Data do último surto: _____

Rubrica do participante _____

Rubrica do pesquisador _____

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

ANEXO IV

DIVULGAÇÃO

O Serviço de Neurologia do HCPA em colaboração com o Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS está realizando um estudo sobre novos fatores genéticos e imunológicos que podem ser importantes no surgimento e progressão da Esclerose Múltipla, sob responsabilidade do Professor José Artur Bogo Chies. Interessados em participar como grupo controle, que é um grupo que vai servir de comparação para o grupo de pacientes estudados, deverão ser maiores de 18 anos e não pode possuir o diagnóstico ou suspeita de Esclerose Múltipla. Para mais detalhes sobre o projeto, entrar em contato com o professor José Artur Bogo Chies, pelo telefone (051) 3308-6740 (dias úteis das 10h às 17h), ou com o pesquisador Lian Lopes Troncoso, pelo telefone (051) 82591035 (em qualquer dia das 10h às 17h).

