



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
DOUTORADO EM NEUROLOGIA

CAMILA RODRIGUES DE ALMEIDA

**FREQUÊNCIA DO ANTICORPO IGG NMO EM PACIENTES COM
NEUROMIELITE ÓPTICA NO RIO DE JANEIRO E SUA INFLUÊNCIA
NO PROGNÓSTICO DA ENFERMIDADE**

RIO DE JANEIRO
2015

CAMILA RODRIGUES DE ALMEIDA

**FREQUÊNCIA DO ANTICORPO IGG NMO EM PACIENTES COM
NEUROMIELITE ÓPTICA NO RIO DE JANEIRO E SUA INFLUÊNCIA NO
PROGNÓSTICO DA ENFERMIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Ulisses Cerqueira Linhares

RIO DE JANEIRO
2015

A447 Almeida, Camila Rodrigues de.
Frequência do anticorpo IGG NMO em pacientes com neuromielite óptica no Rio de Janeiro e sua influência no prognóstico da enfermidade / Camila Rodrigues de Almeida, 2015.
115 f. ; 30 cm

Orientador: Ulisses Cerqueira Linhares.
Dissertação (Doutorado em Neurologia) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

1. Esclerose Múltipla. 2. Neuromielite Óptica. 3. Aquaporina 4.
I. Linhares, Ulisses Cerqueira. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Curso de Doutorado em Neurologia. III. Título.

CDD – 616.834

CAMILA RODRIGUES DE ALMEIDA

**FREQUÊNCIA DO ANTICORPO IGG NMO EM PACIENTES COM
NEUROMIELITE ÓPTICA NO RIO DE JANEIRO E SUA INFLUÊNCIA NO
PROGNÓSTICO ENFERMIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ulisses Cerqueira Linhares
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Profa. Dra. Regina Maria Papais Alvarenga
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Profa. Dra. Claudia Cristina Ferreira Vasconcelos
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

Profa. Dra. Maria Lucia Vellutini Pimentel
Universidade Estácio de Sá - UNESA

Prof. Dr. Marco Antonio Orsini Neves
Centro Universitário Augusto Motta - UNISUAM

DEDICATÓRIA

Aos meus Avós, Jacob e Esther Kleinman que me deram toda estrutura, amor e ensinaram-me a viver com dignidade, iluminando os caminhos obscuros com afeto e dedicação. Os meus agradecimentos pelo sacrifício que passaram para educar-me.

À Clotilde, minha amada baba-mãe que me cercou de mimos, cuidados e muito amor, completando uma lacuna, minha eterna gratidão e amor.

À minha família que inclui minha querida irmã Carolina e meu irmão Caio cuja convivência sempre foi repleta de amizade, honestidade, amor e perseverança.

Ao Rossano, exemplo de amor e dedicação, sem o qual eu não estaria concretizando mais esta etapa de um sonho, o mais importante da minha vida, no qual começo sendo presenteada com: Filipe, Giovana, Gabriela e Rafaela. A eles agradeço a paciência e compreensão pelo tempo deles roubado para a concretização deste projeto.

A minha querida Professora Doutora Regina Maria Papais Alvarenga da qual me orgulho de ter sido aluna desde a graduação ao doutorado, minha eterna gratidão por toda dedicação, paciência e carinho nesta longa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Regina Maria Papais Alvarenga pela confiança depositada no desenvolvimento dessa linha de pesquisa, pela amizade, carinho, orientação e pelos inúmeros conhecimentos transmitidos.

Ao Professor Doutor Ulisses Cerqueira Linhares pelos ensinamentos adquiridos, orientação e incentivo constante durante todo o curso.

Ao Professor Doutor Pietro Novellino, personagem muito importante em minha formação, meu eterno respeito e gratidão.

Ao Corpo Docente do Programa de Pós-Graduação em Neurologia e ao Serviço de Neurologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, setores de excelência da UNIRIO.

Aos médicos e técnicos administrativos do Serviço de Neurologia - Setor de Doenças Desmielinizantes do Hospital Federal da Lagoa pelo carinho e colaboração no desenvolvimento dessa tese.

Aos colegas da Disciplina de Anatomia do Instituto Biomédico da UNIRIO e do Hospital Pró-Cardíaco, por compartilharem responsabilidades e amor pela profissão.

RESUMO

A neuromielite óptica (NMO), ou doença de Devic, é uma enfermidade inflamatória autoimune do sistema nervoso central (SNC), onde se observa a destruição da bainha de mielina e a morte dos neurônios localizados principalmente nos nervos ópticos e na medula espinhal, determinando assim o surgimento de graves quadros de neurite óptica e mielite, que podem ocorrer simultaneamente ou separados por intervalo de tempo variável. Durante muito tempo a NMO foi considerada pelos especialistas como um subtipo particular de esclerose múltipla (EM). Todavia, diferentes tipos de evidências, destacando-se aquelas relacionadas à patologia, aos exames de neuroimagem, às respostas terapêuticas contribuíram fortemente para a sustentação da tese de que a NMO é uma enfermidade distinta da EM. A identificação de anticorpos específicos para a aquaporina-4 (AQP4-IgG), considerado o principal canal de água do SNC, no soro de mais de 2/3 dos pacientes fez crescer o interesse dos pesquisadores, interessados em correlacionar a presença destes autoanticorpos com a gravidade da doença, que no Brasil corresponde a cerca de 15% das doenças desmielinizantes. **Objetivos:** avaliar se a presença do AQP4-IgG está associada aos casos mais graves de NMO e se a soropositividade pode ser considerada um fator preditivo de mal prognóstico na NMO. **Métodos:** 48 pacientes com NMO segundo os critérios de Wingerchuk (2006) foram testados para AQP4-IgG. Nós comparamos status do AQP4-IgG com as características demográficas e clínicas iniciais dos pacientes em seus eventos índices. Usamos o artifício de juntar no mesmo grupo (Modelo Devic), os pacientes com maiores índices de disfunções motoras, visuais e esfinterianas. O estimador de Kaplan-Meier e o teste Log-Rank foram empregados para avaliar a evolução e o prognóstico dos pacientes que atingiram o Modelo Devic. **Resultados:** 52,08% dos pacientes estudados foram soropositivos. Nenhuma diferença demográfica foi observada entre os pacientes. Os pacientes soropositivos apresentaram maiores disfunções no *at nadir* e *at recovery* e apresentaram pior prognóstico em cinco e dez anos de evolução da doença. **Conclusões:** Concluímos que a presença do AQP4-IgG não constitui um mero epifenômeno na NMO, estando associado à maior gravidade e podendo ser considerada como um fator preditivo de mal prognóstico.

Palavras-chave: Esclerose múltipla; Neuromielite óptica; Aquaporina 4

ABSTRACT

The Neuromyelitis optica (NMO), or Devic's disease is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system (CNS), where it is observed the destruction of myelin and death of neurons located mainly in the optic nerves and the spinal cord, determining the emergence of severe cases of optic neuritis and myelitis, which may occur simultaneously or separated by a short interval of time. For a long time NMO is considered by specialists as a particular subtype of multiple sclerosis (MS). However, different evidences highlighting relationship with pathologic examination, neuroimaging and therapeutic responses contributed strongly to support the theory that NMO is a distinct disease out of MS. The identification of specific antibodies for aquaporin-4 (AQP4-IgG), considered the main water channel, in the serum of more than 2/3 of patients has held attention of researchers interested in correlating the presence of such autoantibodies with the severity of the disease, which in Brazil corresponds to about 15% of demyelinating diseases. **Objectives:** To assess whether AQP4-IgG presence is associated with more severe cases of NMO and secondarily if AQP4-IgG seropositivity can be considered a poor prognosis predictor in NMO. **Methods:** 48 patients with NMO according to the criteria Wingerchuk (2006) were tested for AQP4-IgG. Authors compared the status of AQP4-IgG with demographic and clinical characteristics of patients early in their indices events. We arranged together in the same group (Devic's Model), patients with higher levels of motor, visual and sphincter dysfunction. The Kaplan-Meier and log-rank test were used to assess the evolution and prognosis of patients achieving the Devic's Model. **Results:** 52.08% of patients were seropositive. No demographic differences were observed among patients. Seropositive patients had greater dysfunction in *at nadir* and *at recovery* and had poorer prognosis in five and ten years of the disease. **Conclusions:** The presence of AQP4-IgG is not a mere epiphenomenon in NMO, which is associated with increased severity and may be considered as a predictor of poor prognosis.

Keywords: Multiple sclerosis; Optic neuromyelitis; Aquaporin 4

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	RM de crânio indicando a caso de neurite óptica em paciente com NMO.....	18
Figura 2	Ressonância magnética indicando a progressão da atrofia da medula espinhal após sucessivos surtos de NMO-recorrente.....	20
Figuras 3 e 4	Aspectos histopatológico das lesões agudas de NMO.....	28
Figura 5	Lesão de NMO com hialinização dos vasos e infiltração de colágeno.....	29
Figura 6	Distribuição normal de AQP4 nos tecidos do SNC.....	31
Figura 7	Moléculas de aquaporina.....	34
Figura 8	Distribuição normal dos isotipos M1 e M23 nas membranas celulares, vista através da técnica de criofraturas.....	35
Figura 9	Efeito Excitotóxico dos anticorpos anti-AQP4 sobre os astrócitos.	36
Figura 10	Relações entre as proteínas do citoesqueleto com a AQP4.....	38
Figura 11	Células astrogliais com seus pés apoiados sobre os vasos sanguíneos do SNC.....	41
Figura 12	Comparação entre a imunorreatividade para AQP4 em lesões de NMO e EM.....	42
Figura 13	O possível caminho das células do sistema imune do encéfalo para a periferia.....	50
Figura 14	Síntese da Imunopatogênese da NMO.....	52
Figura 15	Plasticidade biológica entre as subpopulações células T e a dependência destas ao grau de maturidade das células dendríticas.....	54
Figura 16	proliferação <i>in vitro</i> de pacientes NMO e indivíduos normais.....	56
Figura 17	Proliferação celular e produção de IL-17 em culturas de CMSP de pacientes com NMO.....	57
Figura 18	Diferenciação de células T CD4+ “naïve”.....	60
Figura 19	Espectro das doenças desmielinizantes idiopáticas no Hospital da Lagoa.....	66

Figura 20	Curva de Kaplan Meier demonstrando o tempo (em 5 anos) para pacientes soropositivos e soronegativos alcançarem o modelo DEVIC.....	77
Figura 21	Curva de Kaplan Meier demonstrando o tempo (em 10 anos) para pacientes soropositivos e soronegativos alcançarem o modelo DEVIC.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios para diagnóstico de NMO.....	21
Quadro 2	Principais diferenças entre NMO e EM.....	22
Quadro 3	Escala expandida do estado de Incapacidade de Kurtzke.....	24
Quadro 4	Da estrutura para doença: A evolução da biologia da aquaporina / a aquaporina.....	32
Quadro 5	Função das moléculas aquaporina -4 (AQP4).....	32
Quadro 6	Principais estudos que correlacionam a positividade do anticorpo com o curso da NMO.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição das características demográficas segundo o IgG NMO status.....	71
Tabela 2	Distribuição das características clínicas segundo o status IgG-NMO.....	73
Tabela 3	Distribuição das características clínicas na última avaliação de acordo com a positividade do anticorpo.....	75
Tabela 4	Modelo Devic comparado aos demais pacientes	76

LISTA DE SIGLAS

Å	ångströms
AQP4	Aquaporina 4
APC	Antigen-presenting cell
BHE	Barreira hematoencefálica
BHE	Barreira hemato encefálica
CR	Cadeira de rodas
cGMP	Monofosfato cíclico de guanosina
CHO	Chinese hamster ovary
DAMPs	Damage-associated molecular pattern molecules
DCs	Dendritic Cells
DDII	Doenças desmielinizantes idiopáticas inflamatórias
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAAT2	<i>Excitatory Amino Acid Transporters</i>
EAE	Encefalomielite alérgica experimental
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EM	Esclerose múltipla
FDA	Food and Drug Administration
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
HLA	Human Leukocyte Antigens
IFN	Interferon
TNF- α	Interferon alfa
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Igs	Isotipos das imunoglobulinas

IL	Interleucinas
LPS	Binding proteins and receptor
MBP	Proteína básica de mielina
MS	Multiple sclerosis
MT	Mielite transversa
NO	Neurite óptica
NMO	Neuromielite óptica
NMOR	Neuromielite óptica recorrente
NK	natural killer
OAPs	Conjuntos de formato ortogonal
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PLP	Proteolipid protein myelin
PRR	Pattern recognition receptor
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
FS	Sistemas funcionais
SN	Sistema nervoso
SNC	Sistema nervoso central
TCR	T cell receptor
TLR	toll-like receptors
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
VCAM	Vascular cell adhesion protein

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	ASPECTOS CLÍNICOS E O DIAGNÓSTICO DA NMO.....	18
2.2	PROGNÓSTICO E EVOLUÇÃO DA NMO.....	22
2.3	TRATAMENTO.....	25
2.4	OS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA NMO.....	26
3	IMUNOPATOGÊNESE DA NMO: AS MOLÉCULAS DE AQUAPORINA, OS ANTICORPOS ANTI-AQUAPORINA-4 E O PAPEL DAS CÉLULAS T, COM SUAS RESPECTIVAS CITOCINAS	30
3.1	AS MOLÉCULAS DE AQUAPORINA.....	30
3.2	OS ANTICORPOS ANTI-AQP4.....	37
3.2.1	OS ANTICORPOS ANTI-AQP4 E A SUA RELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA.....	44
3.3	O PAPEL DAS CÉLULAS T E SUAS RESPECTIVAS CITOCINAS NA ETIOPATOGÊNESE DA NMO.....	49
4	HIPÓTESE	63
5	OBJETIVO	64
5.1	OBJETIVO GERAL.....	64
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
6	MATERIAL E MÉTODO	65
6.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	65
6.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	65
6.3	COLETA DE DADOS.....	66
6.4	DEFINIÇÃO DE CASO.....	67

6.5	DEFINIÇÃO DOS DESFECHOS.....	67
6.6	VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DESCRITIVAS.....	68
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
7	RESULTADOS	70
7.1	COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES NMO DE ACORDO COM O IGG STATUS.....	70
7.2	ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	77
7.3	MORTALIDADE.....	78
8	DISCUSSÃO	79
9	CONCLUSÃO	90
10	ÉTICA	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE	113

1 INTRODUÇÃO

A neuromielite óptica (NMO), ou doença de Devic, é uma enfermidade inflamatória autoimune do sistema nervoso central (SNC), onde se observa a destruição da bainha de mielina e a morte dos neurônios localizados principalmente nos nervos ópticos e na medula espinhal, determinando assim o surgimento de graves quadros de neurite óptica e mielite, que podem ocorrer simultaneamente ou separados por curto intervalo de tempo (DEVIC, 1895; WINGERCHUK et al., 2007).

No que concerne à distribuição mundial, enquanto a EM é altamente prevalente nas populações caucasianas do hemisfério norte, a NMO é mais frequente entre os asiáticos (KIRA et al., 1999) e nas populações de descendência africana (CABRERA-GOMEZ et al., 2009).

Cerca de 2/3 dos pacientes com NMO são do sexo feminino, tendo sido a doença por muito tempo considerada pelos neurologistas um subtipo particular de esclerose múltipla (EM).

Todavia, diferentes tipos de evidências, destacando-se aquelas relacionadas à patologia, aos exames de neuroimagem (MANDLER et al., 1993; WINGERCHUK et al., 1999) e às respostas terapêuticas (MANDLER, AHMED, DENCOFF, 1998; WEEINSHENKER, 2001) contribuíram fortemente para a sustentação da tese de que a NMO é uma enfermidade distinta da EM. Além disso, a identificação de anticorpos específicos para a molécula de aquaporina-4 (AQP4) (LENNON et al., 2004, 2005), considerada como o principal canal de água do SNC, com expressão constitutiva nas células astrogliais dos espaços subaracnóides de todos os locais de interface com sistema líquido (2006; JUNG et al., 1994a; NIELSEN et al., 1997; NAGELHUS et al., 1998; MOBASHERI et al., 2007), fez crescer ainda mais o interesse da comunidade científica, atenta para a possibilidade de se compreender melhor a patogênese desta enfermidade, que passou ser definitivamente considerada uma doença distinta da EM (LENNON et al., 2004).

No Brasil, segundo Papais-Alvarenga e cols. (2002), a NMO é responsável por aproximadamente 15% das doenças desmielinizantes do SNC.

Embora no início a NMO tenha sido considerada uma doença de evolução monofásica, a maior parte dos pacientes (> 80%) desenvolve a chamada forma recorrente, intercalando surtos repetidos de mielite transversa (MT) e/ou neurite óptica (NO). De uma maneira geral, a evolução da NMO é mais desfavorável do que

a EM, havendo maior incapacidade neurológica, a qual pode ser revelada pelo EDSS (Expanded Disability Status Scale), uma escala criada por Kurtzke para quantificar os diferentes graus de incapacidade dos pacientes com distúrbios neurológicos (KURTZKE, 1983). Além disso, a perda de acuidade visual nos pacientes com NMO também costuma ser mais grave (PAPAI-ALVARENGA et al., 2008), sendo mais refratária ao tratamento com corticosteróides do que na EM, mesmo quando estas drogas são usadas em doses mais elevadas do que a habitual (WINGERCHUK et al., 1999). Tal fato pôde ser experimentalmente demonstrado por Linhares et al em 2013, quando células mononucleares periféricas de pacientes com NMO em período de remissão se mostraram significativamente mais resistentes ao tratamento com dexametasona quando comparadas ao grupo controle, constituído de indivíduos normais (LINHARES et al., 2013a). Ademais, tem sido levantada a hipótese de que os quadros mais graves de neurite óptica e mielite associadas à NMO podem estar relacionadas à positividade e possivelmente aos títulos dos autoanticorpos anti-AQP4 (JARIUS et al., 2012; KISTER et al., 2013; MATTHEWS et al., 2013; NARAPORN et al., 2013), o que tornaria estes anticorpos mais do que um epifenômeno na imunopatogênese da NMO.

A neuroepidemiologia das doenças desmielinizantes idiopáticas no Brasil é a principal linha de investigação do grupo de neurociências do programa de Pós-Graduação em Neurologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Após o reconhecimento da NMO recorrente como uma condição distinta da EM (PAPAI-ALVARENGA et al., 2002), um número crescente de pacientes com esta enfermidade vem sendo diagnosticado e acompanhados longitudinalmente no Serviço de Neurologia, do Hospital da Lagoa, centro de referência do Ministério da Saúde para tratamento destas doenças.

Nos estudos publicados pelos pesquisadores do grupo de neurociências/CNPQ/UNIRIO, ficou demonstrado que as características demográficas desta coorte diferem das séries internacionais pela alta miscigenação, com 60% de pacientes com origem afro-brasileira.

Embora a NMO seja uma doença rara em todo o mundo, a frequência relativa de NMO entre casos de EM variou entre 20% a 27% nos afrodescendentes enquanto entre caucasianos do hemisfério norte é de apenas 1,2% (PAPAI-ALVARENGA et al., 2014).

Esta pesquisa translacional visa proporcionar uma interface básica ao estudo clínico das DDII e se baseia na colaboração entre pesquisadores da UNIRIO e os de Málaga (Espanha) visando preencher, uma lacuna existente no que diz respeito à frequência de positividade do IgG NMO em pacientes brasileiros e sua influência no curso clínico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS CLÍNICOS E O DIAGNÓSTICO DA NMO

Clinicamente a NMO costuma se apresentar através de surtos agudos, simultâneos ou recorrentes de NO ou MT extensa, que em pouco tempo pode levar os pacientes a graves incapacidades neurológicas. A NO da fase aguda da NMO (Figura 1), caracteriza-se por déficit visual que pode ser completo ou não, uni ou bilateral, evoluindo com déficit de visão para as cores ou sombras, com variados graus de reversibilidade. Tudo isto podendo coexistir com exame de fundo de olho normal ou com apenas moderado grau de papiledema. Já nos casos crônicos, pode-se observar a palidez da papila e a atrofia completa do nervo óptico (PAPAI-ALVARENGA et al., 2008).



Figura 1: RM de crânio indicando a caso de neurite óptica em paciente com NMO.

Os surtos medulares da NMO se caracterizam por extensas lesões inflamatórias que progressivamente podem levar a graves atrofia da medula espinhal (Figura 2) que se manifestam clinicamente por sinais de secção completa ou parcial da medula espinhal. Na fase aguda, pode haver paralisia com abolição dos reflexos superficiais e profundos. Já na fase crônica, observam-se os sinais de liberação medular, como hiperreflexia, hipertonia espástica, espasmos em flexão ou extensão e o surgimento do sinal de Babinski. Frequentemente os sintomas de mielite transversa se iniciam com os pacientes queixando-se de dores que começam na coluna vertebral e se estendem transversalmente. Já os sinais de lesões posteriores da medula cervical caracterizam-se por sensações de choque que percorrem longitudinalmente a coluna vertebral de cima para baixo e se irradia aos quatro membros, quando o paciente flete o pescoço. As alterações esfínterianas vão, em escala de gravidade, da urgência miccional até a perda total do controle dos esfínteres, com a necessidade do uso de sondas de forma temporária ou permanente (PAPAI-ALVARENGA, 2006).

A presença de soluço, vômito, desvios da língua, paralisia e alterações de sensibilidade facial e surdez podem ser indicativos de doença grave, devido ao acometimento do tronco cerebral, o que pode ser constatado pela presença de lesões inflamatórias no bulbo, ponte e mesencéfalo, observadas na ressonância magnética (RM). Os surtos óptico-medulares, isto é, os acometimentos simultâneos dos nervos ópticos (uni ou bilateralmente) e da medula são incomuns, todavia eles podem ocorrer logo no início da enfermidade ou em qualquer momento nas formas recorrentes (NAKASHIMA et al., 2006; WINGERCHUK et al., 2007).

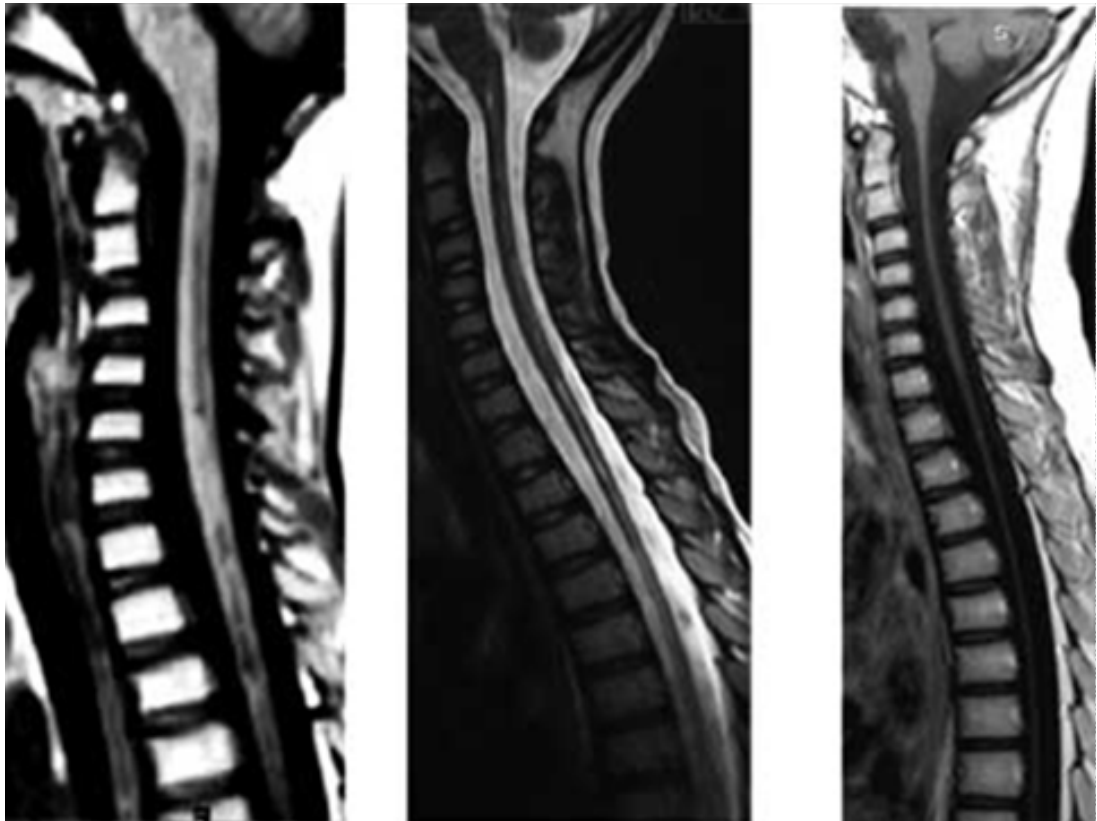


Figura 2: Ressonância magnética indicando a progressão da atrofia da medula espinhal após sucessivos surtos de NMO-recorrente (DIMITRIJEVIC, 2012).

Os critérios para o diagnóstico da NMO sofreram muitas mudanças desde que, em 1894, Eugene Devic sugeriu que a enfermidade poderia se tratar de uma síndrome neurológica específica. Todavia, somente em 1996 foi publicado o primeiro estudo na literatura ocidental, que descrevia de forma consistente os perfis clínicos e laboratoriais da NMO (O'RIORDAN, 1996).

Em 1999, uma proposta mais consistente, baseada em critérios clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e radiológicos foi apresentada por Wingerchuk e cols. (2006) para o diagnóstico da NMO. Todavia, foi somente em 2004, após a identificação dos anticorpos anti-AQP4, que uma nova revisão dos critérios de diagnóstico de NMO foi apresentada pelo próprio Wingerchuk e cols. (2006). Nesta revisão, os autores passaram a incluir a dosagem sérica dos autoanticorpos anti-AQP4 (IgG-NMO) como um dos critérios menores para o diagnóstico desta enfermidade. Assim, a NMO passou então a ser clinicamente definida quando os pacientes apresentassem pelo menos dois eventos agudos de neurite e/ou mielite, além da presença de dois dos três critérios a seguir: 1) RM de crânio normal, 2) RM

da coluna vertebral apresentando lesão extensa, acometendo mais de três segmentos vertebrais e 3) a positividade do anticorpo anti-AQP4 (Quadro 1).

Neuromielite óptica
Critérios absolutos
1. Neurite óptica
2. Mielite aguda
Critérios de suporte laboratorial (dois dos três)
1. RM cerebral negativa no início
2. RM da medula espinhal com anormalidades de sinais estendendo-se a mais do que 3 segmentos vertebrais
3. Positividade do IgG-NMO

Quadro 1: Critérios para diagnóstico de NMO (WINGERCHUK et al., 2006)

A NMO tem a EM como o seu principal diagnóstico diferencial. Todavia, nem sempre é possível, à primeira vista, firmar um diagnóstico preciso, sendo frequentemente necessário algum tempo até que isto possa ser feito por um neurologista experiente. As principais características que permitem o diagnóstico diferencial entre essas duas enfermidades podem ser resumidas no quadro abaixo (Quadro 2).

Principais diferenças entre NMO e EM

Características		Neuromielite Óptica	Esclerose Múltipla
Média de idade		39 anos	29 anos
Sexo (F:M)		9:1	2:1
Início e curso da doença		Inicia sempre com surto 80-90% do tipo recorrente 10-20% com curso monofásico	85% forma remitente-recorrente 15% progressiva primária
Acometimentos bilaterais		comuns	incomum
Gravidade da perda da visão		Maior, com menor recuperação	Menor, com melhor recuperação
Lesões da substância branca cerebral a MRI		Incomuns Cavitações frequentes	comuns Cavitações raras
Mielite transversa : lesões extensas acometendo + 3 segmentos da medula espinhal		comum	incomum
Análise do líquido	Bandas Oligoclonais	Raramente (< 15%)	Frequentes (85%)
	Pleiocitose e conteúdo proteico	Pleiocitose frequente com aumento de polimorfonucleares e células mononucleares Proteínas mais elevadas que na EM	Pequena pleiocitose Mais baixo que na MNO
Tratamento	Drogas imunomoduladoras	Ineficazes podendo causar o agravamento	Efetivas

Adaptado: Hoorbakht, 2012 / Wingerchuk, 2007

Quadro 2- Principais diferenças entre NMO e EM

2.2 PROGNÓSTICO E EVOLUÇÃO DA NMO

O prognóstico da NMO costuma ser ruim, cerca de 50% dos pacientes tornam-se incapazes de deambular, com grave perda da visão em pelo menos um dos olhos após cinco anos após início do primeiro surto, não obstante haja pacientes que inexplicavelmente passem anos livres de novos surtos visuais ou medulares, ainda que os seus surtos iniciais tenham sido graves. Outros enfermos, contudo, desde o início já apresentam nítidos sinais de evolução desfavorável da sua

enfermidade, quase sempre necessitando de cuidados de terapia intensiva desde o princípio, sobretudo quando há sinais de mielites extensas muito altas, causando problemas respiratórios (AKMAN – DEMIR et al., 2011).

Os surtos medulares e do tronco cerebral, mais do que os surtos de NO e eventuais lesões cerebrais, costumam predispor os pacientes a complicações graves, que vão desde a paralisia dos músculos envolvidos com a respiração, até as complicações infecciosas dos pulmões e das vias urinárias. A presença de produtos microbianos circulantes pode levar a um aumento dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6, IL-1 β e fator de necrose tumoral TNF- α , liberadas tanto pelos elementos da resposta imune inata quanto da adaptativa (CHEN; SZODORAY; ZEHER et al., 2015; MORRIS et al., 2015). O aumento dos níveis séricos dessas citocinas pode ter implicações diretas nas recaídas clínicas e no agravamento das incapacidades neurológicas, já que aumentam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), favorecendo assim a passagem de produtos solúveis e de células do sistema imune para dentro do parênquima cerebral (GAVINS et al., 2012).

Os surtos ópticos ou medulares costumam surgir abruptamente, ocorrendo em poucas horas ou poucos dias, podendo fazer com que os pacientes necessitem rapidamente de cuidados de terapia intensiva. Assim, embora a terapia imunossupressiva, com corticoesteróide em altas doses na forma de pulso, não produza na NMO os mesmos efeitos terapêuticos observados na EM, ela deve ser instituída imediatamente após a constatação da existência de um novo evento óptico ou medular.

Não obstante alguns grupos de pesquisadores virem nos últimos anos tentando estabelecer correlações entre as elevações dos títulos dos anticorpos anti-AQP4 e o desenvolvimento de novos surtos (JARIUS et al., 2008; WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2008), não há até o momento nenhum marcador seguro capaz de prever em que momento o paciente entrará em surto e muito menos ainda a gravidade do mesmo.

As primeiras escalas de aferição de incapacidade surgiram em 1955, após os trabalhos pioneiros do neuroepidemiologista americano John F. Kurtzke com pacientes de EM (KURTZKE, 1955). Após alguns ajustes e revisões, a escala proposta Kurtzke por passou a ser utilizada por neurologistas do mundo inteiro (KURTZKE, 1983, 1970) (Quadro 3).

0.0	- Exame neurológico normal (FS grau 0).
1.0	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS (1 FS 1).
1.5	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS, excluindo função cerebral grau 1 (mais de 1 FS 1).
2.0	- Deficiência mínima em 1 FS (1 FS 2, outros 0 ou 1).
2.5	- Deficiência mínima em 2 FS (2 FS 2, outros 0 ou 1).
3.0	- Deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3, outros 0 ou 1) ou deficiência leve em 3 ou 4 FS (3 ou 4 FS 2, outros 0 ou 1), embora com marcha livre.
3.5	- Marcha livre, mas com deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3) e 1 ou 2 FS 2, ou 2 FS 3, ou 5 FS 2 (outros 0 ou 1).
4.0	- Marcha livre sem órtese, independente, por 12 h/dia apesar de deficiência relativamente severa de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo os limites dos passos anteriores, capaz de andar sem auxílio e sem descanso por 500 metros.
4.5	- Marcha livre sem auxílio durante grande parte do dia, capaz de trabalhar o dia todo, pode, contudo, ter alguma limitação para atividade livre ou requerer mínima assistência; caracterizado por deficiência relativamente severa consistindo de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores e marcha livre por 300 metros.
5.0	- Marcha livre por 200 metros; deficiência severa atrapalhando as atividades diárias; geralmente 1 FS 5 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores.
5.5	- Marcha livre por 100 metros; deficiência severa para impedir as Atividades de Vida Diária (AVD), (1 FS 5, outros 0 ou 1).
6.0	- Auxílio intermitente ou unilateral (bengala, muleta, aparelho tutor, órtese) necessário para andar 100 metros com ou sem descansar (+ de 2 FS 3).
6.5	- Auxílio bilateral constante para andar 20 metros (+ de 2 FS 3).
7.0	- Incapaz de andar 5 metros mesmo com auxílio, necessita de cadeira-de-rodas (CR) comum e faz transferência sozinho, toca a CR por 12 h/dia (= de 1 FS 4; muito raramente só 1 FS 5).
7.5	- Incapaz de andar mais que poucos passos, restrito à CR, pode precisar de auxílio para transferência, toca a CR, mas não pode se manter na CR comum o dia todo. Pode necessitar de CR motorizada (+ de 1 FS 4+).
8.0	- Essencialmente restrito ao leito ou CR, pode ficar na CR boa parte do dia, mantém muitos cuidados pessoais, geralmente tem o uso efetivo dos membros superiores (FS 4 em muitos sistemas).
8.5	- Restrito ao leito boa parte do dia, tem alguma função de membros superiores; mantém alguns cuidados pessoais (FS 4 em vários sistemas).
9.0	- Dependente no leito; pode se comunicar e se alimentar (FS 4 na maioria).
9.5	- Totalmente dependente no leito, incapaz de deglutir ou se alimentar (todos os FS 4 ou 5).
10.0	- Morte devido as complicações da Esclerose Múltipla

Quadro 3 Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS) (KURTZKE, 1983, 1970)

2.3 TRATAMENTO

A abordagem terapêutica da NMO pode ser dividida em tratamento de curto prazo, para o controle do surto agudo, e o tratamento imunomodulador de longo prazo, para reduzir o risco de novos surtos.

Os corticosteróides são as drogas de escolha para o tratamento dos surtos agudos, uma vez que reduzem o edema inflamatório, restauram a integridade da BHE e inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BARNES, 1998).

Dos corticosteróides disponíveis no mercado, a metilprednisolona é a mais utilizada para a terapia das formas agudas de todas as doenças desmielinizantes, todavia, estas drogas não se mostram inteiramente eficientes para a prevenção de novas recaídas de NMO, na qual, frequentemente, as doses empregadas para o tratamento dos surtos não se mostram tão eficazes quanto para a EM (FILIPPINI et al., 2000).

Outra opção de tratamento para NMO é plasmaférese, geralmente indicada nas situações de falha terapêutica para a indução de remissão dos surtos com os corticosteróides (KEEGAN et al., 2002).

Nos últimos anos, várias classes diferentes de fármacos com propriedades imunossupressoras têm sido usadas isoladamente ou de forma combinada, objetivando a profilaxia de novos surtos nos pacientes com NMO. Uma dessas substâncias é a azatioprina, que combinada à prednisona oral, tem se mostrado razoavelmente eficaz na prevenção de surtos por períodos relativamente longos (MANDLER et al., 2001).

Drogas imunomoduladoras aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América para o tratamento da EM, também têm sido testadas na NMO, não havendo, contudo, até o momento, comprovação da eficácia dessas substâncias no tratamento desta doença (RIZVI; AGIUS 2004). Dessas drogas imunomoduladoras, três versões diferentes de interferons beta: o IFN-1a e o IFN-1b intramusculares e IFN-1a subcutâneo, estão disponíveis no mercado para o tratamento de EM. Elas inibem a proliferação de leucócitos e a apresentação de antígenos, modulam a produção de citocinas e direcionam a cascata de sinalização intracelular para a secreção de produtos antivirais, apresentam atividade anti-proliferativa e imunomoduladora, através da liberação de citocinas anti-inflamatórias,

as quais são capazes de impedir a transmigração de células do sistema imune através da BHE pela inibição da atividade das metaloproteinases (RIZVI; AGIUS 2004). Apesar de todas as vantagens terapêuticas apresentadas, a eficácia dos interferons no tratamento da NMO ainda não pode ser confirmada.

Além dos interferons, os anticorpos monoclonais humanizados dirigidos para vários marcadores das células do sistema imune têm mostrado resultados promissores na modificação do curso da EM (VIRLEY, 2005) e possivelmente da NMO. Entre esses anticorpos é possível destacar os monoclonais direcionados para o CD52 (alemtuzumabe), CD25 (daclizumabe) e para CD20 (rituximabe e ocrelizumabe) (KIM et al., 2011).

O rituximabe e o ocrelizumabe são capazes de promover a depleção de células B (CD20⁺), reduzindo assim a produção de anticorpos, tais como a IgG anti-AQP4 nos pacientes com NMO (KIM et al., 2011), cujos níveis séricos curiosamente podem até se elevar na segunda semana após o início da terapia com o rituximabe. Tal fenômeno se deve provavelmente a existência de plasmócitos de vida longa que, por não expressar o marcador CD20, são insensíveis à ação do rituximabe (NAKASHIMA et al., 2006).

Outras opções de tratamento que precisam ser mais bem investigadas incluem o mitoxantrone, uma droga com propriedades imunossupressoras, aprovada pelo FDA para os casos de EM refratárias ao tratamento com IFN-beta, e outras substâncias como o cladribine, fingolimode, teriflunomide, fiategraste, laquinimode e o fumarato oral.

Esses achados demonstram a dificuldade atual em tratar a NMO. Esta dificuldade, em parte, está associada a nossa escassez de conhecimento a respeito da imunopatologia da neuromielite óptica.

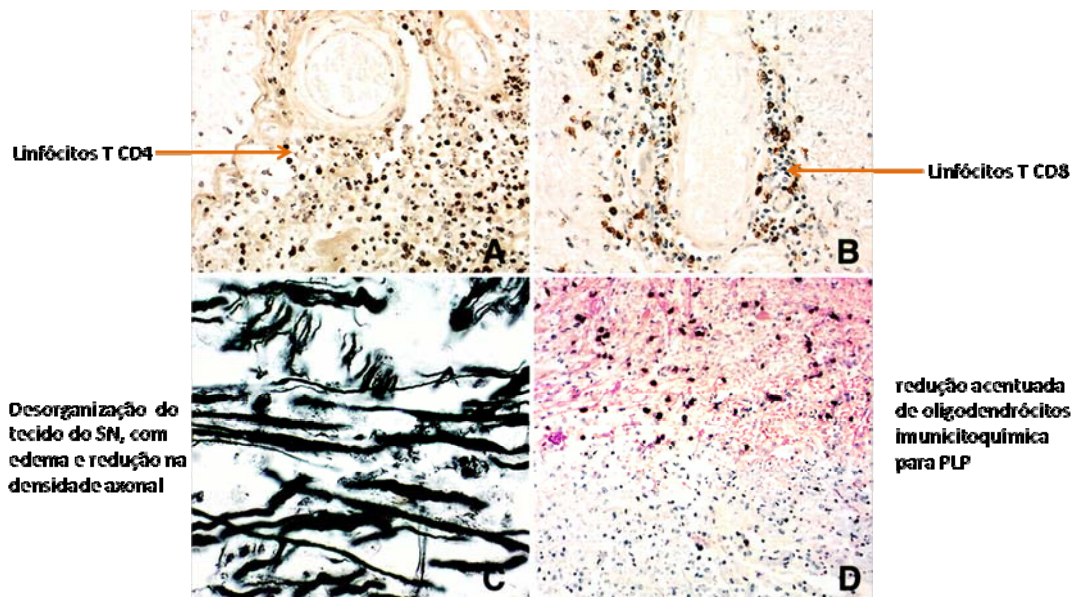
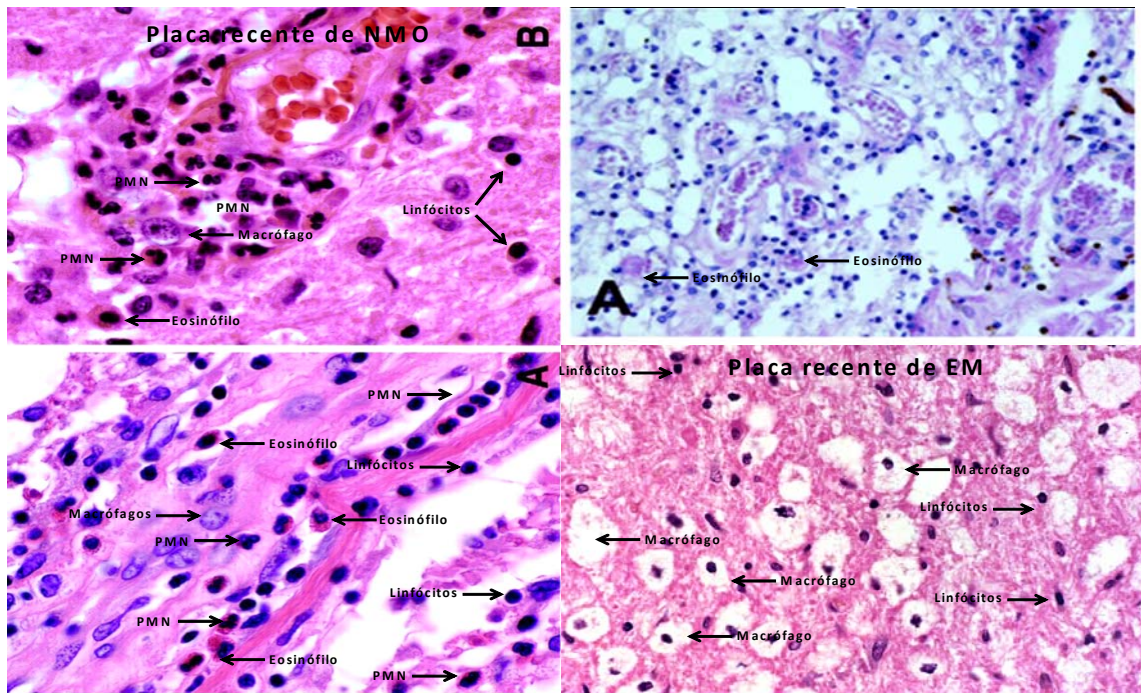
2.4 OS ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS DA NMO

As lesões da NMO se caracterizam pelo caráter agudo e padrão vasculocêntrico dos infiltrados inflamatórios, os quais são frequentemente acompanhados por áreas isoladas ou coalescentes de necrose que podem acometer, simultaneamente ou não, os nervos ópticos e segmentos extensos da medula espinhal, sendo o tronco cerebral e o cérebro raramente atingido. É possível

observar, além dos elementos celulares próprios da imunidade adaptativa (células B e T), uma infiltração maciça de macrófagos, eosinófilos (172 a 215 células/mm²) e neutrófilos (64 a 688 células/mm²), em conjunto com a proliferação microglial e vascular (LUCCHINETTI et al., 2002).

Apesar da expressão dos receptores das quimiocinas CCR5 e CXCR3 terem sido observados em leucócitos presentes em todas as lesões de NMO, a marcação imunológica para ambas as moléculas foi mais intensa nos leucócitos perivasculares localizados nas áreas de desmielinização. Ademais, no exame histoquímico, as lesões perivasculares são marcadas pela perda perivascular de AQP4 associada à deposição de imunocomplexos contendo produtos ativados da cascata do complemento, particularmente os da homopolimerização do componente C9 do complemento (LUCCHINETTI et al., 2002). A análise dos isotipos das imunoglobulinas (Igs) depositadas evidenciou imunoreatividade mais pronunciada para IgM e IgG (SORENSEN et al., 1999).

Nas figuras abaixo, é possível comparar os aspectos histopatológicos distintos das lesões agudas de NMO e EM, tornando mais evidente que se tratam de doenças diferentes com aspectos histopatológicos bastante distintos (Figuras 3 e 4).



Histopatologia da neuromielite óptica. O traço perivascular contém numerosos linfócitos T CD3+ (A) e os linfócitos T CD8+ (B). (C) Há uma marcante redução na densidade axonal e edema (3 e shows a) e migração de prata, mag × 400). (D) Há uma redução acentuada em oligodendrócitos no interior da lesão [ARA]m PLP de mielinização in situ (preto); duplamente marcada com imunocitoquímica da proteína de PLP (vermelho, mag × 200).

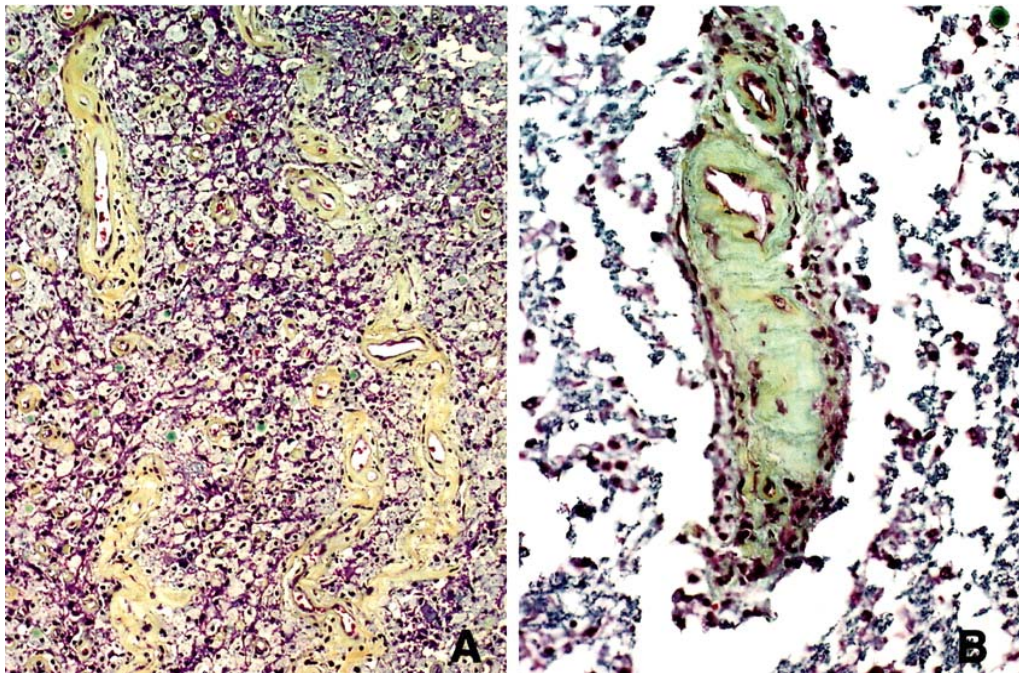
Lucchinetti CF. *Brain*. 2002 Jul;125(Pt 7):1450-61.

Figuras 3 e 4: Aspectos histopatológicos das lesões agudas de NMO.

As lesões crônicas são caracterizadas por gliose, degeneração cística e cavitação, com atrofia do tecido do sistema nervoso, incluindo o nervo óptico. O aumento no número de vasos sanguíneos com paredes espessadas e hialinizadas

também fazem parte do quadro histopatológico, juntamente com a perda de mais de 90% da imunorreatividade para AQP4, sobretudo nas lesões perivasculares da substância cinzenta central. As perdas de imunorreatividade para AQP4 são significativamente maiores nas lesões de NMO se comparadas com as da EM, não se observando o mesmo com relação à proteína básica da mielina. A coloração para proteína fibrilar ácida glial (GFAP) é fraca no interior das lesões, todavia é muito forte na astrogliose observada das regiões perilesionais, onde curiosamente é acompanhada pelo aumento da expressão de AQP4 (MISU et al., 2006, 2007) (Figura 5).

Apesar dos estudos relatarem claramente o envolvimento dos diferentes tipos de leucócitos na gênese da NMO, poucos trabalhos foram conduzidos na tentativa de delinear o caráter funcional dessas células, particularmente dos linfócitos T, os quais são essenciais para o desenvolvimento das respostas imunes.



NMO: (A) Há evidente aumento no número de vasos sanguíneos hialinizadas com paredes espessadas pela infiltração de colágeno no interior da lesão (Movat, mag \times 100). (B) A figura enfatiza a infiltração de colágeno da parede do vaso (verde com Movat, mag \times 400). Lucchinetti CF. *Brain*. 2002 Jul;125(Pt 7):1450-61.

Figura 5: Lesão de NMO com hialinização dos vasos e infiltração de colágeno

3 IMUNOPATOGÊNESE DA NMO: AS MOLÉCULAS DE AQUAPORINA, OS ANTICORPOS ANTI-AQUAPORINA-4 E O PAPEL DAS CÉLULAS T, COM SUAS RESPECTIVAS CITOCINAS

3.1 AS MOLÉCULAS DE AQUAPORINA

Embora a etiopatogenia da NMO seja ainda desconhecida, a imunidade humoral sempre pareceu desempenhar um papel relevante na imunopatogênese da enfermidade, sobretudo por conta das características dos processos inflamatórios das lesões que sempre demonstraram a presença de imunocomplexos perivasculares contendo moléculas de IgG e IgM, produtos da degradação do complemento e a presença de elementos da resposta imune inata (neutrófilos e eosinófilos) e macrófagos em grande quantidade, contendo restos de mielina fagocitados. Além disso, células de resposta imune adaptativa como os linfócitos B e T (principalmente Th1 e Th17), se encontram também fortemente representados (WINGERCHUK et al., 1999; LUCCHINETTI et al., 2002; ARGYRIOU; MAKRIS, 2008; LEFKOWITZ; ANGELO, 1984).

Os estudos que se seguiram a descoberta dos anticorpos anti-AQP4 também identificaram perdas significativas das moléculas alvo destes anticorpos, nas regiões centrais das lesões dos nervos ópticos, da medula espinhal e do tegmento mesencefálico, onde as moléculas de AQP4 se encontram representadas sobre os pés das células astrogiais (ROEMER et al., 2007; SINCLAIR et al., 2007).

Todavia, os trabalhos que mostraram as perdas de AQP4 nas lesões de NMO só foram possíveis após a identificação, através de estudos com imunofluorescência indireta (LENNON et al., 2004) dos autoanticorpos voltados para as moléculas de aquaporinas descritas pouco tempo antes por Peter Agre et al. (2008).

As moléculas de aquaporinas constituem uma família de proteínas integrais de membranas, quais são altamente conservadas ao longo da escala filogenética, e são responsáveis pelo fluxo principalmente, mas não exclusivamente, de água entre os meios intra e extracelulares. Estas estruturas constituem os principais canais de água do SNC. Elas podem ser observadas em todas as regiões do

encéfalo e medula, mas sobretudo nas áreas de interface com o sistema liquórico (Figura 6).

Distribuição normal da AQP4 no tecido do SNC

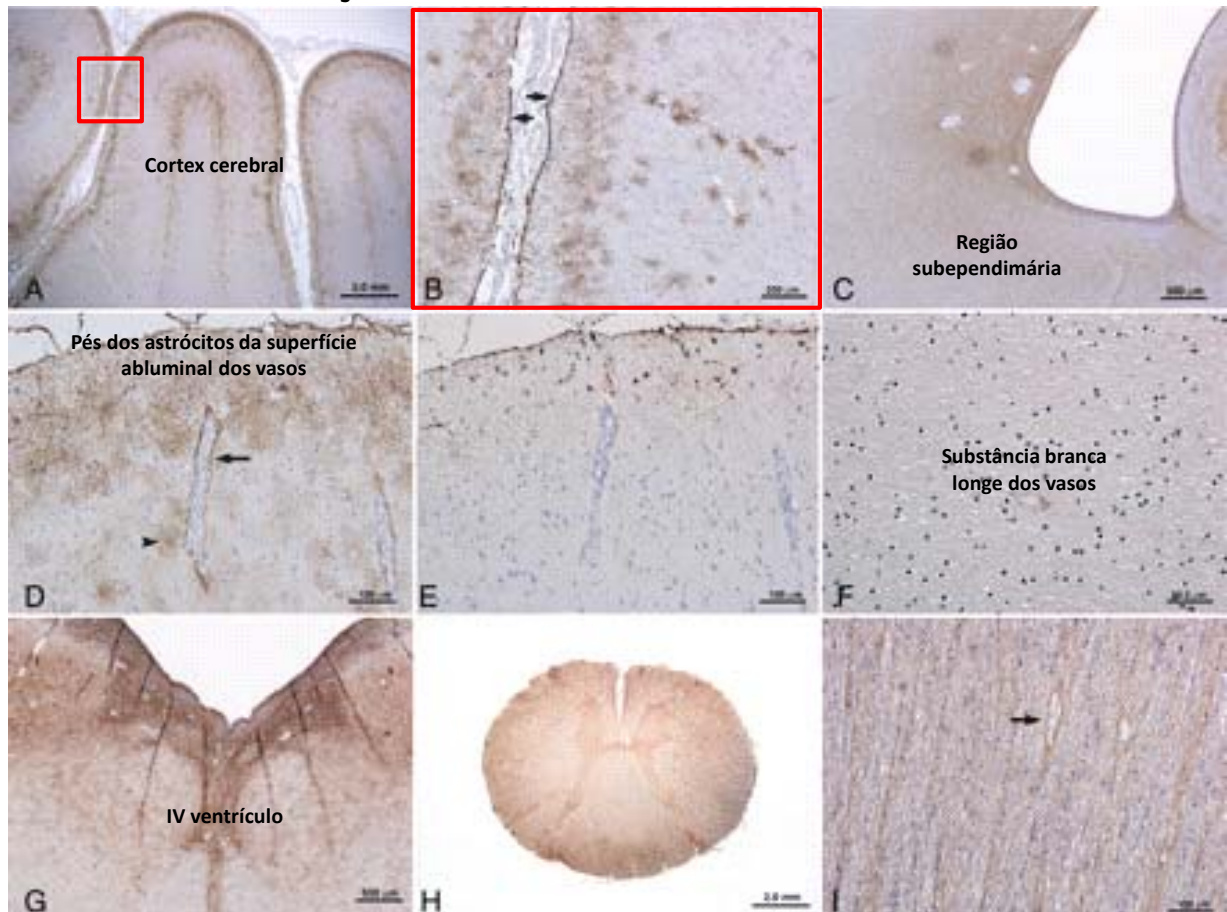


Figura 6. Distribuição normal de AQP4 nos tecidos do SNC (PITTOCK et al., 2006).

Dos 13 diferentes tipos de moléculas de aquaporina identificadas, a AQP4, cujo gene no homem se encontra no cromossoma 8, representa o principal canal de água do SNC (Quadros 4 e 5) (Figura 7) (VERKMAN, 2005).

Aquaporina	Órgão	Permeabilidade
AQP0	Cristalino	Água
AQP1	Hemácias, rim, pulmão, olho, endotélio vascular	Água, K ⁺ , Na ⁺ , CO ² , NH ³
AQP2	Rim, ducto deferente	Água
AQP3	Rim, pele, olho, cólon	Água, glicerol
AQP4	Cérebro, músculo esquelético, rim, pulmão, estômago, intestino delgado	Água
AQP5	Glândulas salivar e lacrimal, pulmão, córnea	Água
AQP6	Rim	Água, ânions
AQP7	Tecido adiposo, rim, testículo	Água, glicerol
AQP8	Testículo, rim, fígado, pâncreas, intestino delgado, cólon	Água, uréia
AQP9	Fígado, leucócitos, cérebro, testículo	Água, glicerol
AQP10	Intestino delgado	Água, glicerol

Fonte: Molecular cell Biology, 2004: Vol 5 687-698 / Genome Biology, 2006: Vol 7:206

Quadro 4: Localização das moléculas de aquaporina nos tecidos dos mamíferos e sua permeabilidade

<ul style="list-style-type: none"> • É uma das moléculas mais abundantes no cérebro • É particularmente prevalente em membranas dos astrócitos na interface entre sangue-SN e SN-líquor • Regulação do volume extracelular • Fluxo de potássio • Circulação de fluido cerebrospinal • Reabsorção de fluido intersticial • Depuração de resíduos • Neuroinflamação • Osmosensibilidade • Migração celular • Sinalização via Ca²⁺ • É necessário para a função normal da retina e do ouvido interno
--

Quadro 5: Função das moléculas aquaporina -4 (AQP4)

As moléculas de aquaporina são muito importante em vários processos fisiológicos, sendo o conhecimento desses essenciais para as futuras intervenções em processos patológicos (FURMAN et al., 2003; JIN; ROSSI; VERKMAN, 2011) (FIGURA 8).

À semelhança das demais aquaporinas, as moléculas de AQP4 estão reunidas nas membranas celulares na forma de tetrâmeros, os quais podem ser observados à microscopia eletrônica através de técnicas de criofraturas (HIROAKI et al., 2006). Os monômeros, em forma de ampulhetas, apresentam um poro central de aproximadamente 2,8 ångströms (Å), os quais permitem a passagem em altíssima velocidade de uma única molécula de água por vez, isto é, na forma de gás, com um rendimento médio de 3×10^9 moléculas por monômero por segundo (KOZONO et al., 2002; DOMENE et al., 2003; HIROAKI et al., 2006; VON HEIJNE, 2006).

As análises algorítmicas e de sequenciamento dos aminoácidos das moléculas das aquaporinas revelaram a existência de seis domínios transmembrânicos em alfa-hélice, unidos por cinco “*loops*”, dos quais três (A, C e E) são extracelulares e dois (C e D) estão voltados para interior das células. Revelou também a existência de sequências altamente conservadas de asparagina-prolina-alanina entre o segundo e terceiro e entre o quinto e sexto domínios transmembrânicos, os quais são responsáveis pelo encurtamento dos *loops* e pelo dobramento da molécula sobre si mesma, dando ao monômero o seu aspecto habitual em forma ampulheta (JUNG et al., 1994b; COOPER; BORON, 1998; NAKHOUL et al., 1998; COOPER et al., 2002; YOOL, 2002; UEHLEIN et al., 2003; YU et al., 2006; WANG et al., 2007). A união de quatro monômeros resulta na formação de um quinto poro central adicional para o qual tem sido proposto se tratar de um canal dependente de cGMP, para a passagem de íons, gases e outros solutos pequenos (Figura 7) (ANTHONY et al., 2000).

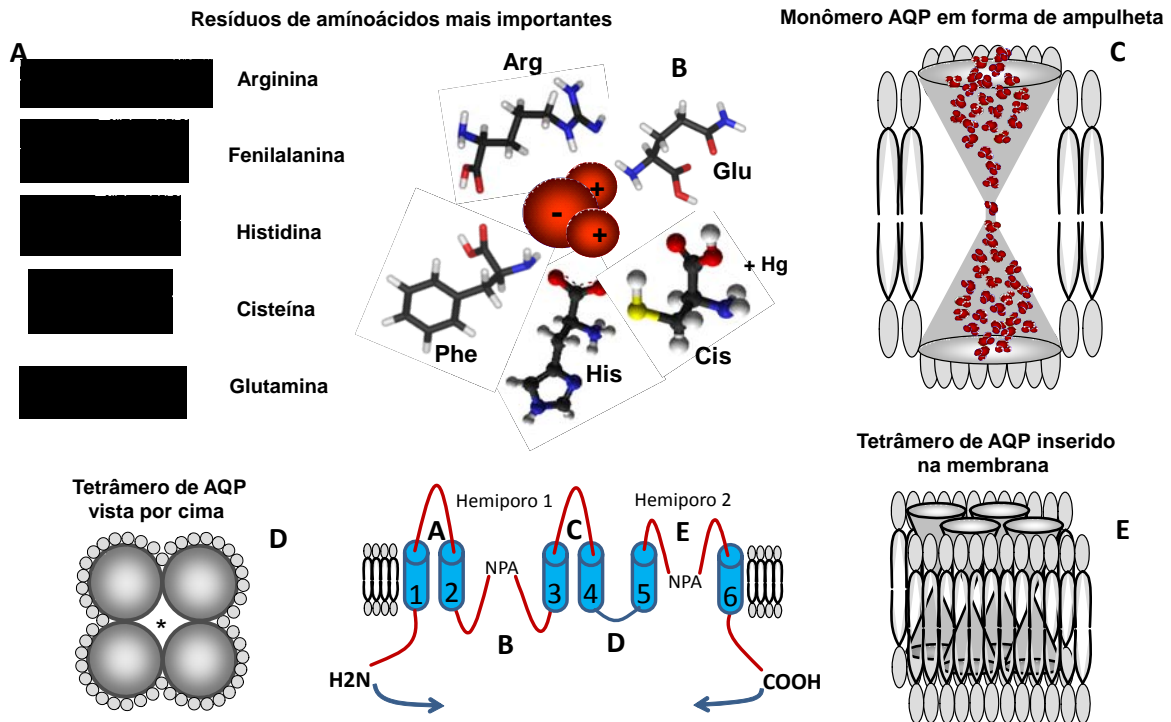


Figura 10. Representação esquemática de um tetrâmero de aquaporina. A e B) aminoácidos formadores dos poros centrais; C, D e E) representação esquemática do ponto mais estreito (2,8 Å) da molécula. A estrutura dos poros de um monômero de AQP-1, que é atravessado por uma molécula de água de cada vez, de acordo com o gradiente osmótico. A poro central está rodeado por resíduos de arginina (Arg) e histidina (His), cuja carga positiva repelem os prótons de hidrogênio das moléculas de água. Dois outros aminoácidos polares, glutamina (Glu) e cisteína (Cys) também participam deste poro. O fluxo de água que atravessa a membrana por meio dos monômeros em forma de ampulheta pode ser bloqueado através da ligação de átomos de mercúrio (Hg) aos resíduos de cisteína dos poros. * Quinto poro central adicional.

Figura 7: moléculas de aquaporina (LINHARES, 2013b)

Seis variantes alternativas para as moléculas de AQP4 (AQP4a, AQP4b, AQP4c, AQP4d, AQP4e e AQP4f) foram identificadas. Destas, as isoformas “AQP4a-M1”, de 34-KDa e “AQP4c-M23”, de 23KDa, estão presentes nos tecidos numa razão de três AQP4-M23 para cada AQP4-M1, respectivamente. Nas membranas celulares, as moléculas de AQP4 estão organizadas em conjuntos de formato ortogonal (OAPs), os quais têm sido observados na superfície de células do sistema nervoso e vários outros tecidos há pelo menos 30 anos (LANDIS; REESE, 1974; RASH; STAEHELIN; ELLISMAN, 1974; HATTON; ELLISMAN, 1982; LU et al., 1996; NEELY et al., 1999). A isoforma M1 (32KDa) apresenta 22 aminoácidos a mais, a partir da extremidade N-terminal, do que a isoforma M23 (Kda). Apesar das duas principais isoformas de AQP4 serem ambas capazes de formar OAPs, os complexos formados por isotipos M23 são maiores e mais estáveis. Todavia, é possível observar OAPs de tamanho intermediários, formados por heterotetrâmeros resultantes da união das isoformas M1 e M3, reunidas duas a duas. Embora o

significado biológico deste tipo de organização na superfície das células não esteja suficientemente esclarecido, admite-se que isto favoreça a permeabilidade da água e, dada a estreita proximidade física existente entre as moléculas de AQP4 e moléculas que compõem o citoesqueleto, contribuir também para a manutenção da polaridade e o aumento da adesividade celular (YANG et al., 1997; VAN HOEK et al., 2000; FURMAN et al., 2003; RASH et al., 2004; SILBERSTEIN et al., 2004; HIROAKI et al., 2006; NICCHIA et al., 2008, 2009; STRAND et al., 2009; ROSSI et al., 2010).

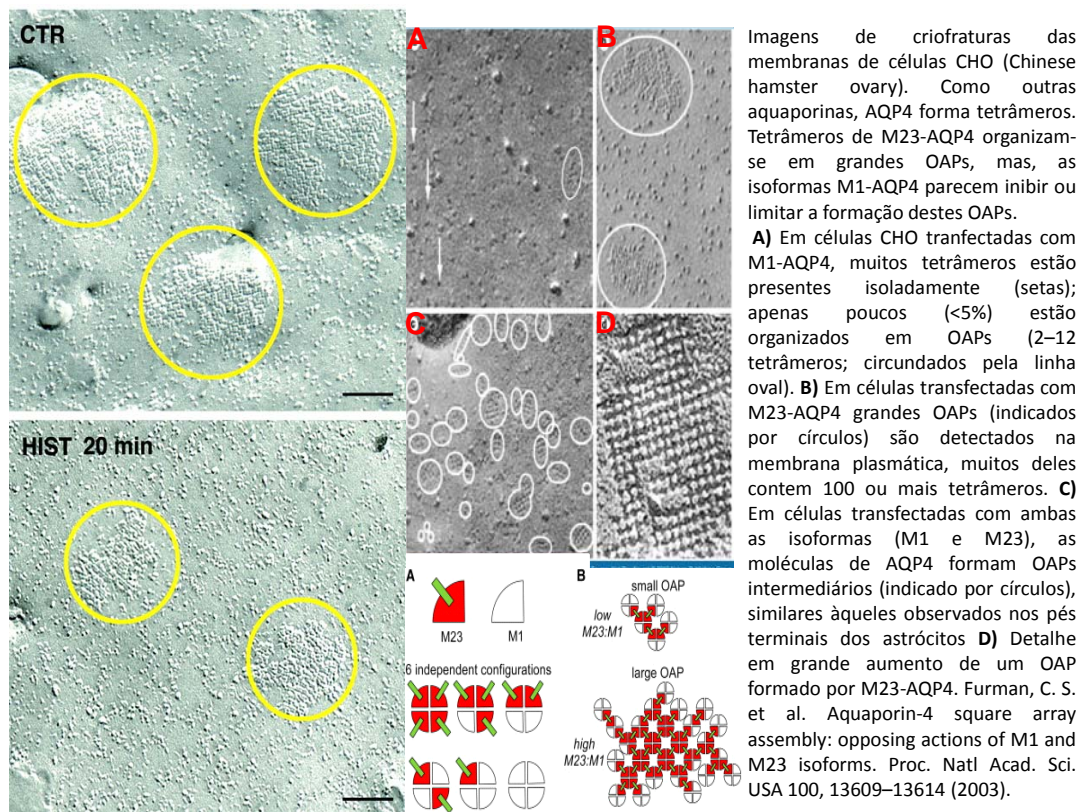


Figura 8: Distribuição normal dos isotipos M1 e M23 nas membranas celulares, vista através da técnica de criofraturas (FURMAN et al., 2003; JIN; et al., 2011).

Através de técnicas de dupla marcação e microscopia eletrônica (*Immunogold electron microscopy*), foi demonstrada a localização das moléculas de AQP4 junto ao Kir4.1, um membro da família de reguladores da entrada de potássio, o qual permite que o influxo de potássio seja maior que o afluxo nas células gliais do cérebro (BUTT; KALSI, 2006; OLSEN; SONTHEIMER, 2008) e junto ao α 1-syntrophin, uma família de cinco proteínas de 60 kDa, cuja expressão está

principalmente confinada ao cérebro, e que estão associadas a distrofina do complexo distroglican (TINSLEY et al., 1994; NEELY et al., 2002; MASAKI et al., 2010; NICCHIA et al., 2010; YURCHENCO, 2011). Há fortes evidências de que este complexo macromolecular possa ser ainda maior, isto se levarmos em consideração que anticorpos anti-AQP4 são capazes de promover a *downregulação* do EAAT2 (*Excitatory Amino Acid Transporters*), um transportador de glutamato pertencente à família dos transportadores de neurotransmissores, os quais servem para extinguir o efeito excitatório do glutamato através da remoção deste neurotransmissor da fenda sináptica das células gliais (ANDERSON; SWANSON, 2000; HINSON et al., 2008).

Os anticorpos Anti-AQP4 produzidos por linfócitos B juntamente com as proteínas de complemento podem induzir a lise de astrócitos. Na ausência de complemento, o complexo macromolecular formado pelo AQP4 e EAAT2 pode ser endocitado juntamente com os anticorpos anti-AQP4, permitindo que o neurotransmissor (glutamato) permaneça mais tempo na fenda sináptica, levando ao efeito excitotóxico sobre os neurônios observados na NMO (Figura 9).

Efeito excitotóxico do glutamato

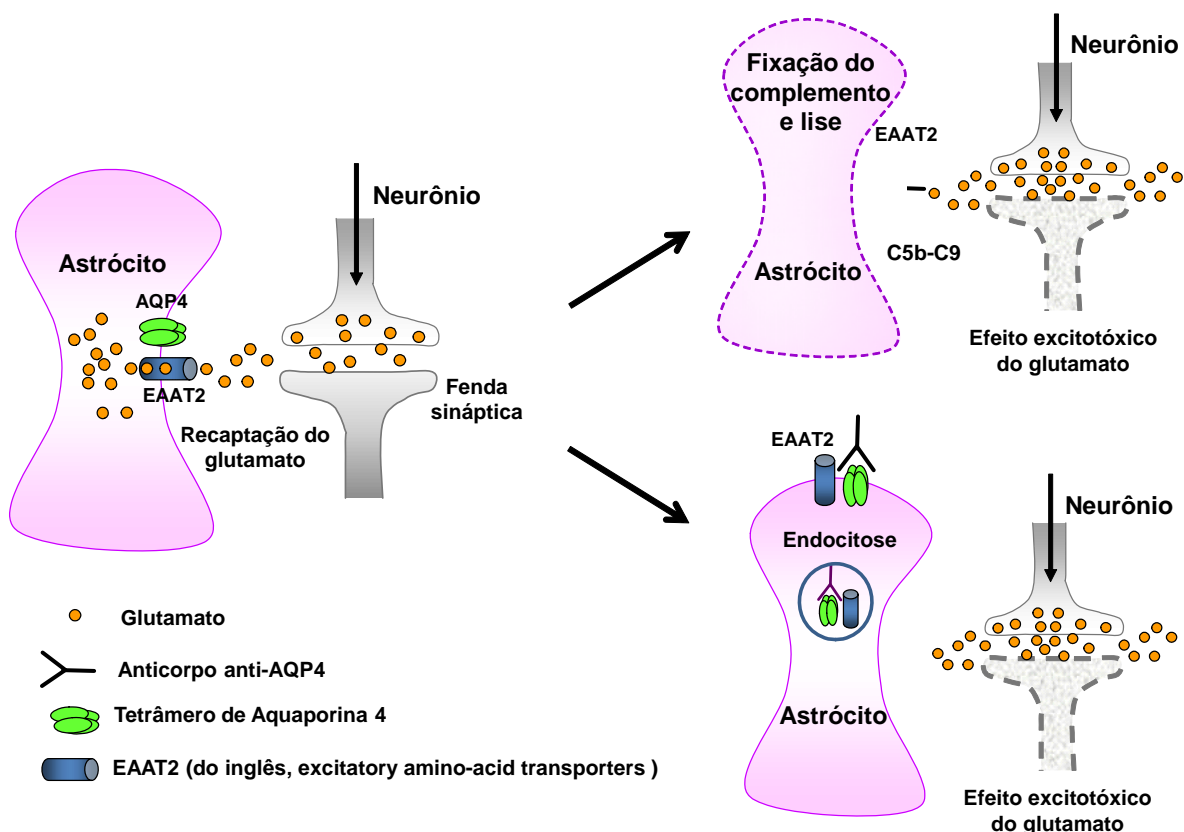


Figura 9: Efeito Excitotóxico dos anticorpos anti-AQP4 sobre os astrócitos (LINHARES, 2013b).

3.2 OS ANTICORPOS ANTI-AQP4

Um conjunto de evidências sugere um possível papel neurotóxico dos anticorpos anti-AQP4 na NMO. Dessas evidências uma das mais importantes foi a demonstração de que os astrócitos de culturas, tratados com o soro inativado de pacientes portadores de NMO, permaneceram com suas membranas integras, mas as moléculas de AQP4 foram endocitadas com concomitante perda de EAAT2. Este achado indica que as moléculas de AQP4 e EAAT2 coexistem como complexos macromoleculares na superfície celular e que a ligação com anticorpos a uma estrutura pode implicar na perda concomitante de função da outra (HINSON et al., 2008). Isto passou a constituir um dos pilares da hipótese da neurotoxicidade dos anticorpos anti-AQP4 na NMO (Figura 11), cuja ligação aos seus alvos na membrana dos astrócitos pode desencadear diversos efeitos potencialmente neuropatogênicos, seja como resultado da endocitose dos complexos moleculares de AQP4 seja pela ativação do complemento, com a lise das células e a subsequente perda de AQP4 e EAAT2 (MISU et al., 2007; ROEMER et al., 2007; HINSON et al., 2008), determinando a quebra da homeostasia tecidual, que se dá em decorrência do aumento da permeabilidade da BHE e aumento do influxo de células inflamatórias para dentro do SNC (ROEMER et al., 2007) (Figura 10).

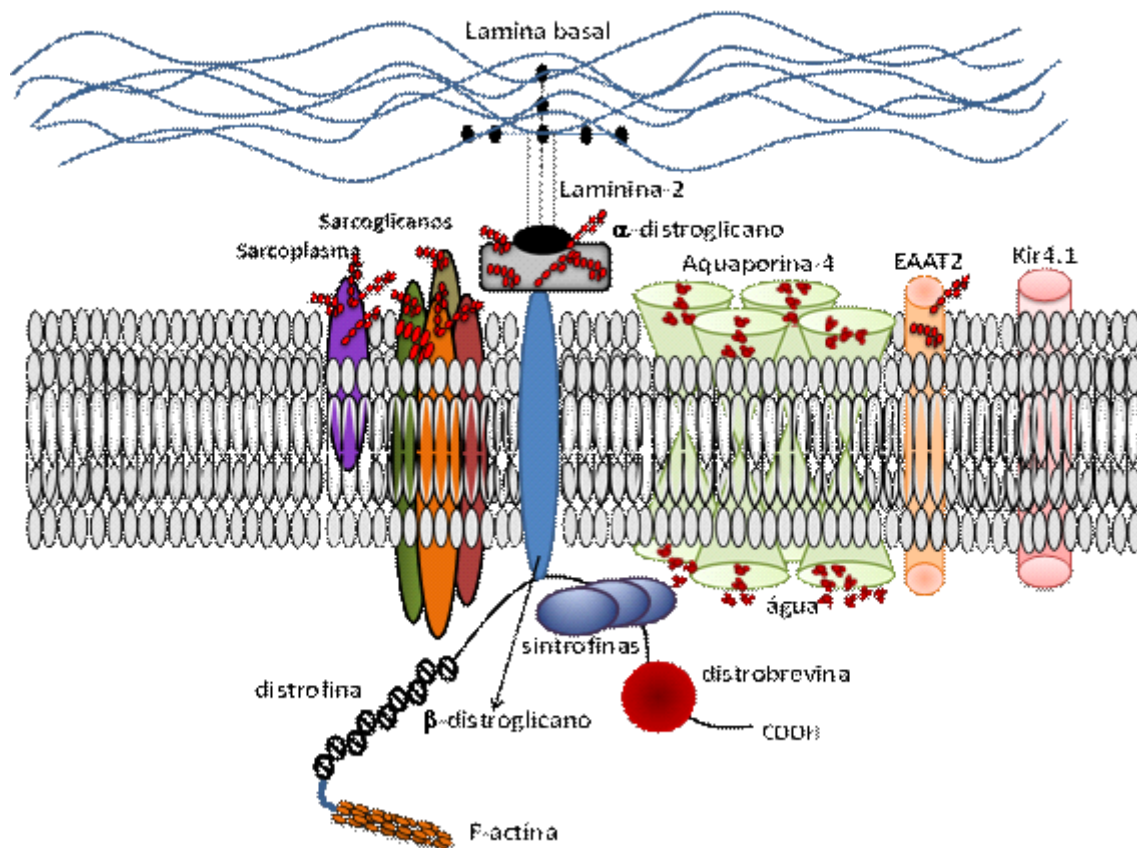


Figura 10: Relações entre as proteínas do citoesqueleto com a AQP4, EAAT2 e Kir4.1 (LINHARES, 2013b).

O complexo distroglicano é formado por um conjunto de proteínas transmembranares as quais são essenciais à manutenção da integridade celular, conectando as proteínas da matriz extracelular ao citoesqueleto. Este complexo é também necessário para a montagem das junções sinápticas e neuromusculares.

Várias moléculas não associadas diretamente a esta função, como as aquaporinas, o EAAT2 e o Kir4.1, parecem estar fisicamente ligadas a este complexo macromolecular, que tem sido relacionado também a diversas enfermidades, como as distrofias musculares.

Os estudos complementares que se seguiram à descoberta destes anticorpos e que empregaram as células HEK 293, ou seja, células que expressam uma das duas principais isoformas de AQP4 (M1 ou M23), demonstraram que os anticorpos da subclasse IgG1 (com especificidade de 98%) e em proporções muito menores os da subclasse IgG2 e IgG3 e IgG4 (KIRA , 2011a, 2011b), oriundos do soro de pacientes com NOM, mas não dos grupos controles, são os que se ligam

com maior especificidade ao AQP4, sobretudo aos epitopos do terceiro domínio extracelular das isoformas M23 nos OAPs, se comparadas aos mesmos domínios nos OAPs formados pelas isoformas M1 ou ainda de moléculas de AQP4 fora de OAPs (TANI et al., 2009; MADER et al., 2010; CRANE et al., 2011; VERKMAN et al., 2011). Apesar de ter sido demonstrado que os anticorpos IgG, que se ligam com alta especificidade (99%) às isoformas M1 e M3, estão significativamente associados a um número maior de surtos e portanto às formas mais graves da doença (JARIUS; WILDEMANN, 2010a; KETELSLEGERS et al., 2011), e que as análises pelo “*Western blot*” terem demonstrado que os anticorpos que reconhecem epitopos específicos das sequências lineares da isoforma M23 sejam os mais específicos para a NMO (MARMETTO et al., 2009; YU et al., 2011), há indícios de que os anticorpos anti-AQP4 não sejam fabricados dentro do tecido sistema nervoso dos pacientes (JARIUS et al., 2011) e que também não sejam capazes de atravessar a BBB de indivíduos normais (BRAD et al., 2009). Todavia, há também indícios de que a entrada dos anticorpos anti-AQP4 e de células imunitárias para dentro do tecido do sistema nervoso possa ser facilitada pelos já descritos anticorpos anti-células endoteliais (*tight junction proteins*), observados por Shizu e cols. (2012) em 71,4% dos casos de NMO por eles estudados (SHIMIZU et al., 2012).

Além dos autoanticorpos da classe G (IgG 1), cerca de 10% dos pacientes com NMO apresentam também em seu repertório de moléculas de imunoglobulinas, autoanticorpos anti-AQP4 carregando isotipos de classe M (IgM), cujo significado clínico ainda não foi esclarecido (JARIUS et al., 2010b).

Apesar das moléculas de AQP4 serem muito conservadas ao longo da escala filogenética, havendo uma forte homologia entre as formas M1 e M23 dos homens e dos camundongos de 92,9% e 94,7%, respectivamente, essas diferenças não parecem ser suficientes para interferir de forma significativa com as moléculas de AQP dos roedores, razão pela qual os resultados obtidos pela imunofluorescência indireta usando tecido de SNC de ratos e camundongos podem ser tidos como confiáveis (LU et al., 1996; HEYMANN; ENGEL, 1999; ZARDOYA; VILLALBA, 2001; HINSON et al., 2007; KALLURI et al., 2011).

O percentual de positividade dos soros dos pacientes com NMO, que raramente ultrapassa os 70%, pode variar muito, de acordo as séries de pacientes estudadas e ainda de acordo com o método empregado (FAZIO et al., 2009; KIM et al., 2011; JARIUS et al., 2014). Além disso, estes mesmos anticorpos podem estar

presentes também no soro de indivíduos com neoplasias (PITTOCK; LENNON, 2008) ou surgir ainda no curso de doenças infecciosas ou autoimunes, como o lúpus eritematoso, Síndrome de Sjogren, esclerose múltipla e miastenia gravis, cujo receptor de acetilcolina curiosamente parece estar também associado ao complexo receptor da AQP4 (JACOBSON et al., 2001; PITTOCK et al., 2008; KARIM; MAJITHIA, 2009; MATSUSHITA et al., 2009; MCKEON et al., 2009; TANAKA K; TANAKA M, 2010).

Apesar das evidências apontadas acima sugerirem fortemente uma participação dos anticorpos anti-AQP4 na etiopatogenia da NMO, algumas considerações podem por em “xeque” o real papel dos anticorpos na enfermidade. Em primeiro lugar, mesmo na presença de altos títulos de anticorpos anti-AQP4, alguns pacientes permanecem em remissão (NAKASHIMA et al., 2006), havendo ainda casos onde os anticorpos estão presentes em indivíduos que nunca apresentaram qualquer manifestação neurológica de NMO (PITTOCK; LENNON, 2008). Pelo fato das moléculas de AQP4 se encontrarem sobre os pés dos astrócitos além da barreira hematoencefálica, parece haver a necessidade de fatores adicionais que rompam a barreira e favoreçam a entrada dos anticorpos (Figura 11).

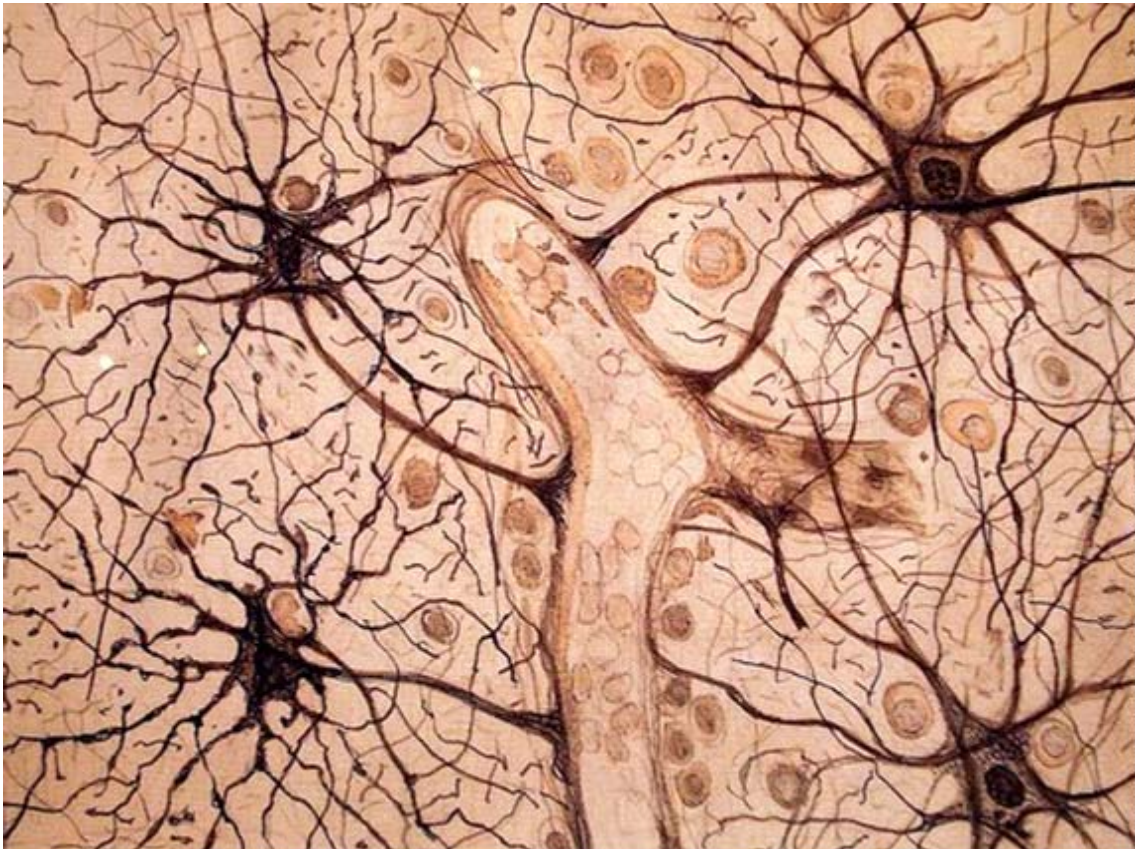


Figura 11: Células astrogliais com seus pés apoiados sobre os vasos sanguíneos do SNC. (Fonte: <http://www.grupoescolar.com/pesquisa/astrocitos.html>)

Além do mais, alguns estudos sugerem que os títulos de anti-AQP4 não têm relação com a gravidade dos surtos (HINSON et al., 2009; MATSUSHITA, 2009).

Em modelos animais, tem sido demonstrada a necessidade da presença de células T específicas para diferentes antígenos, tais como proteína básica da mielina, proteína proteolípídica e glicoproteína de oligodendrócito como pré-requisito para o desenvolvimento de uma doença semelhante à NMO (MINOHARA et al., 2001; BRAD et al., 2009).

Outra questão que merece ser considerada é que não obstante a presença de AQP4 sobre os pés dos astrócitos de diferentes partes do SNC não há nada, até o momento, que justifique o predomínio das lesões no nervo óptico e na medula espinhal, deixando de fora outros sítios igualmente ricos em moléculas de AQP4, tais como a substância cinzenta cerebral, o cerebelo ou ainda a retina, cujas células de Müller são os equivalentes aos astrócitos ricos em AQP4. Esta questão também pode ser estendida para as regiões fora do SNC, como a mucosa gástrica, os

túbulos renais, os músculo esquelético, os testículos e os pulmões os quais são da mesma forma, ricos em moléculas de AQP4 (LENNON et al., 2005; WINGERCHUK et al., 2007; KIRA, 2011b).

As justificativas apresentadas para os problemas relacionados acima talvez contribuam para explicar os motivos pelos quais os filhos de mulheres com NMO não nasçam com a doença, não obstante suas mães sejam anti-AQP4 positivas e os anticorpos (IgG) em questão atravessem facilmente a barreira placentária. É possível que expliquem ainda as perdas de AQP4 no centro das lesões quando estas deveriam ocorrer principalmente nas regiões perivasculares onde há uma densidade maior de moléculas de AQP4 e uma maior deposição de anticorpos e subprodutos da degradação do complemento (MISU et al., 2006; 2007) (Figura 12).

Imunorreatividade para AQP4 nas lesões ativas de NMO (A) e MS (B).

Lucchinetti CF. Brain. 2002 Jul;125 (Pt 7):1450-61

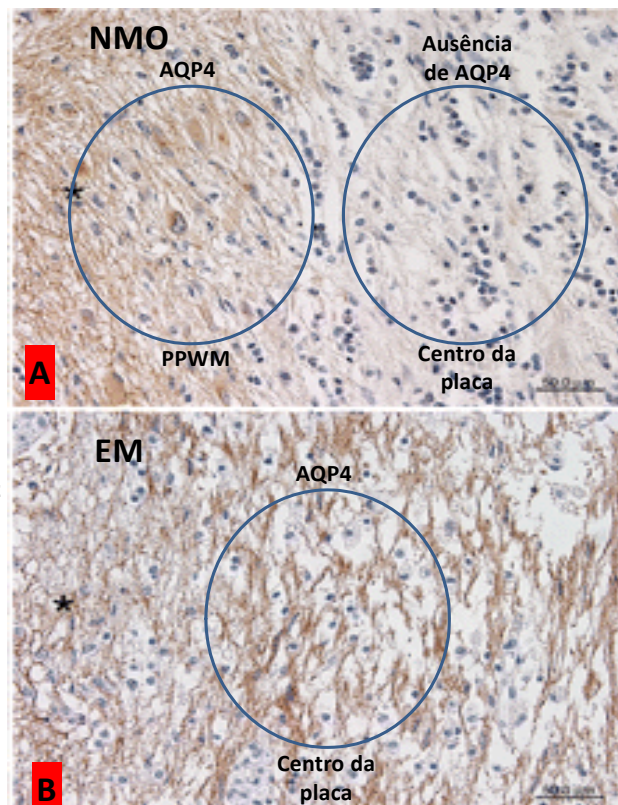


Figura 12. Comparação entre a imunorreatividade para AQP4 em lesões de NMO e EM.

Embora alguns pesquisadores admitam que os anticorpos anti-AQP4 sejam os responsáveis pela NMO, pelas razões apresentadas acima parece haver também

entre os especialistas uma tendência em admitir que estes anticorpos podem surgir secundariamente no curso da enfermidade. Todavia, mais do que um mero epifenómeno, é provável que esses anticorpos tenham uma participação verdadeiramente efetiva na patogênese da NMO, justificando assim o fato da sua presença ter sido adotada como um dos critérios menores para o diagnóstico da doença, sendo inclusive em alguns casos considerada como um fator preditivo de gravidade da enfermidade (WINGERCHUK et al., 2006).

Todavia, apesar de estar presente em um número significativo alto de pacientes e de se ligarem com alta especificidade a um antígeno bem definido, as moléculas de IgG1 isoladas de indivíduos com NOM não são, por si só, capazes de induzir neuromielite óptica, mesmo se inoculadas com complemento no peritônio ou diretamente na veia de camundongos (BRADL et al., 2009). Além disso, quando esses anticorpos foram injetados em ratos jovens, quando a BBB não se encontra ainda bem formada, ao contrário do se poderia esperar, não foi possível observar o surgimento de qualquer alteração neurológica (BRADL et al., 2009). No entanto, uma doença semelhante à NMO pode ser produzida se esses mesmos anticorpos forem injetados diretamente por via intratecal ou no peritônio dos animais após a indução de encefalite alérgica experimental (EAE), o que indica a necessidade de células T previamente ativadas nos sítios de inflamação (BRADL et al., 2009; KINOSHITA et al., 2009; SAADOUN et al., 2010).

Várias interpretações diferentes têm sido dadas para os fatos assinalados acima, até mesmo a de que, apesar da grande semelhança entre as moléculas de aquaporina-4 humanas e dos camundongos, as moléculas de anti-AQP4 são as mesmas e, podendo haver problemas quanto à acessibilidade dos anticorpos injetados aos epítopos dos antígenos dentro do tecido do sistema nervoso central dos animais. Entretanto, a dificuldade que os anticorpos têm de atravessar a BBB não parece estar relacionada apenas com a questão das imunoglobulinas serem ou não xenogênicas, uma vez que até mesmo nas regiões circunventriculares, onde as junções entre as células endoteliais não são tão apertadas, os anticorpos têm dificuldade para entrar em concentrações elevadas o suficiente para causar danos ao tecido na ausência de inflamação e de células encefalitogênicas (BRADL et al., 2009). Apesar de tudo, como já destacamos, alguns autores vêm chamando a atenção para a existência de uma relação direta entre os títulos de anti-AQP4 com

atividade e a gravidade da NMO (JARIUS et al., 2008; WEINSTOCK-GUTTMAN et al., 2008).

Cumprе ressaltar ainda que, na imunopatogênese de várias doenças autoimunes para as quais já se identificou a presença de autoanticorpos e antígenos específicos circulantes, frequentemente é possível observar a presença de títulos elevados desses autoanticorpos sem que, contudo, haja aumento clinicamente identificável da atividade da doença e vice-versa. Assim, após o quanto foi visto, é possível admitir que o surgimento e a evolução de enfermidades como a NMO não decorram exclusivamente da presença dos anticorpos anti-AQP4, mas sim de um conjunto muito mais complexo de fatores, envolvendo a ruptura do delicado equilíbrio entre células B, células T efectoras e T reguladoras (MAURI; BLAIR, 2010; MATSUSHITA et al., 2010).

3.2.1 OS ANTICORPOS ANTI-AQP4 E A SUA RELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA

Desde a descoberta dos anticorpos anti-AQP4 e a sua inclusão como um dos critérios (menores) para o diagnóstico da doença, diferentes grupos de pesquisadores vêm discutindo a real participação desses anticorpos na imunopatogênese desta enfermidade. Entretanto, pelas razões apontadas acima, não foi possível até o momento definir de forma incontestada se a presença dos anticorpos constitui um fator que possa ser considerado com preditivo de gravidade (SIRITHO et al., 2014), o que tem levado vários grupos de pesquisadores a se ocuparem desta tarefa.

Numa revisão sistemática conduzida com fito de se identificar as publicações que nos últimos 6 anos deram conta da possível relação entre a soropositividade dos anticorpos anti-AQP4 e a gravidade das manifestações clínicas da NMO, nós encontramos, usando como base de dados MEDLINE/Pubmed, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), SciELO e Lilacs, 206 trabalhos usando como palavra-chave: *seropositive and seronegative neuromyelitis optica*.

Na base de dados MEDLINE/Pubmed, foram selecionados como filtros trabalhos em humanos, publicados entre setembro de 2006 e 5 de setembro de 2014 (data da realização da busca) e os idiomas inglês, francês, espanhol e português.

Os critérios de inclusão dos artigos foram:

- Tipos de estudo: estudos observacionais, retrospectivos ou prospectivos, que avaliaram aspectos demográficos, clínicos e paraclínicos de pacientes com neuromielite óptica;
- Amostragem incluindo pacientes de qualquer faixa etária, sexo, raça/etnia, com o diagnóstico de Neuromielite Óptica estabelecido pelos critérios de Wingerchuk (2006).
- Data de publicação: setembro de 2006 a 5 de setembro de 2013;

Os critérios de exclusão dos artigos foram:

- Artigos de revisão
- Relatos de caso
- Estudos interessados na análise de outros aspectos diferentes dos objetivos da análise, isto é, anticorpos anti-AQP4 na neuromielite óptica.
- Estudos restritos a uma faixa etária;
- Estudos em animais;
- Diagnóstico de NMO não baseado nos critérios de Wingerchuk (2006).

As análises dos trabalhos permitiram identificar 40 publicações com as palavras-chave *seropositive and seronegative neuromyelitis optica*. Destes trabalhos, em 16 (40%) os autores encontram pelo menos um tipo de correlação entre a presença ou ausência dos anticorpos anti-AQP4 com as diferentes apresentações clínicas da NMO. Assim, Akman-Demir e cols. (2011), demonstraram, numa série de 35 pacientes turcos com NMO, que 60% (21) eram anti-AQP4 positivos e destes 11 tinham um EDSS de 6.0 ou mais, enquanto apenas 2 pacientes soronegativos tinham graves incapacidades neurológicas ($p < 0,05$). Os casos soropositivos tinham EDSS médio de 5,1 +/-2,2, comparado com 3,3 +/- 1,7 dos soronegativos ($p < 0,01$).

Houve uma maior tendência de soropositividade entre as mulheres e predominância de cursos monofásicos entre os soronegativos, não havendo diferenças significantes entre soropositivos e soronegativos quanto a duração da doença, idade do início da doença e o número de surtos.

You e cols., (2010), em estudo de uma série de 41 pacientes, demonstraram que 29 pacientes (70,7%) eram soropositivos para anti-AQP4. Destes pacientes, a maior parte teve lesões longitudinais medulares mais graves.

Lai e cols. (2011) demonstraram a presença dos anticorpos anti-AQP4 em 11 (32,4%) dos 34 pacientes por eles estudados. Cinco pacientes soropositivos tiveram neurite óptica recorrente mais grave e com títulos de anticorpos significativamente mais elevados do que os seis pacientes que tiveram um único episódio de NO. Os pacientes soropositivos tiveram desfecho visual significativamente pior do que os pacientes soronegativos ($p = 0,025$). Durante uma média de 32 meses de “*follow-up*”, dois de 11 pacientes soropositivos (18,2%) desenvolveram mielite transversa clinicamente incompleta, não havendo sintomas correlatos entre os pacientes soronegativos (LAI et al., 2011).

Contrastando com os autores acima citados, Jiao e cols. (2013) não encontraram diferenças significantes entre os grupos soropositivos (67%) e soronegativos (37%) de 163 pacientes com NMO de uma coorte da Clínica Mayo.

Resultados semelhantes aos obtidos por Jião et cols. (2013) também foram encontrados por Chanson e cols. (2013), que não encontraram correlação entre os títulos de anticorpos antiAQP4 e a gravidade da enfermidade.

Na China, Yang e cols. (2013) relataram que o título médio de anticorpos anti-AQP4 foi significativamente maior nos pacientes com NMO do que em pacientes com outras doenças autoimunes do SNC. Além disso, demonstraram que os pacientes anti-AQP4-positivos tiveram maior número de surtos de mielite transversa acometendo mais de três segmentos, e mais episódios de neurite óptica do que os pacientes soronegativos.

No Japão, Takahashi e cols. (2007) observaram que de 21 pacientes com NMO, quinze eram NMO-IgG-positivo e seis foram NMO-IgG-negativo. Os títulos mais elevados de anticorpos anti-AQP4 foram associados com a cegueira completa e lesões medulares mais extensas na RM. A extensão das lesões da medula espinhal na RM foram positivamente correlacionados com os títulos de anticorpos anti-AQP4 no nadir de exacerbações. Alguns doentes que tiveram lesões menores (aproximadamente 1 a 2 segmentos vertebrais) da medula espinhal na RM também foram soropositivos com baixos anti-AQP4 títulos de anticorpos, mas tinham outras características clínicas e de ressonância magnética sugestivas de NMO. Os títulos de anticorpos Anti-AQP4 se tornou menor após o uso de metilprednisolona em alta

dose, e um “*follow-up*” dos pacientes mostrou que os títulos de anticorpos anti-AQP4 permaneceu baixo em períodos livres de recidiva sob imunossupressão. Os autores concluíram que os títulos de anticorpos anti-AQP4 têm implicações clínicas significantes na imunopatogênese da NMO (TAKAHASHI et al., 2007).

Em Taiwan, Wang e cols. (2011a) observaram que 41% dos seus 34 pacientes com NMO eram anti-AQP4 positivos e que o grau de incapacidade neurológica avaliado pela escala de EDSS foi significativamente maior nos pacientes soropositivos.

Num estudo multicêntrico conduzido por Jarius e cols. (2012) foi demonstrado que, na análise sistemática das características clínicas e paraclínicas associadas as doenças do espectro da NMO em pacientes caucasianos de acordo com positividade dos anticorpos anti-AQP4, os pacientes soropositivos eram predominantemente do sexo feminino ($p < 0,0003$) e experimentaram recaídas clínicas mais graves. A acuidade visual durante os surtos de neurite óptica aguda foi mais frequente entre os pacientes soropositivos ($p < 0,002$). Os sintomas motores foram mais comuns nos pacientes soropositivos, a carga total de lesão da medula espinal foi maior ($p < 0,006$), e lesões com 3 ou mais segmentos vertebrais, bem como todo o envolvimento da medula espinal, foram mais frequentes ($p < 0,003$ e $p < 0,043$). Por outro lado, NO bilateral no início foi mais comum nos soronegativos ($p < 0,007$), como também foi a simultaneidade de NO e mielite ($p < 0,001$). O tempo para o diagnóstico de NMO foi menor no grupo de soronegativos ($p < 0,029$). O curso da doença foi mais frequentemente monofásico nos soronegativos ($p < 0,008$). Os pacientes soropositivos e soronegativos não diferiram significativamente em relação à idade de início e tempo de recaída, as taxas de reincidência anual, resultado de recaída (completa, parcial, sem recuperação), aumento anual do EDSS, índice de mortalidade, lesões cerebrais supratentoriais, lesões de tronco encefálico, história de carcinoma, frequência de infecções precedentes ao diagnóstico, bandas oligoclonais, ou pleocitose no líquido cefalorraquiano. Tanto o tempo de recidiva quanto o tempo de diagnóstico foram maiores quando a doença começou com NO ($p < 0,002$ e $p < 0,013$). Os sintomas motores ou tetraparesia seguindo-se à primeira mielite no primeiro ano foram identificados como possíveis preditores de gravidade da doença (Quadro 6).

Referência	Nº pc com NMO	% de anti-AQP4 +	Sexo ♀/♂	NO em pc anti-AQP4+	MT em pc anti-AQP4+	Surtos	Relação entre positividade do anticorpo e gravidade da doença (EDSS)	Conclusões mais relevantes dos autores
Takahashi et al., 2007. Brain	21	74,5	♀ > ♂ Surtos + graves ♀	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	Os títulos de anti-AQP4 tem implicações clínicas e imunológicas significativas na NMO
You et al., 2010. Zhonghua Yi Xue Za Zhi	41	70,7	♀ > ♂ Surtos + graves ♀	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	A soropositividade está relacionada com sintomas mais graves e pode predizer um agravamento da NMO
Akman-Demir et al., 2011. J Neurol	35	60	♀ > ♂ Surtos + graves ♀	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	O anticorpo anti-AQP4 pode ter um importante significado prognóstico indicando um curso mais grave da doença
Wang et al., 2011 ^a . Eur Neurol	34	41	♀ > ♂	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	Lesões medulares extensas conjuntamente com a testagem do anticorpo, pode permitir um diagnóstico precoce de NMO e auxiliar nas decisões terapêuticas
Jarius et al., 2012. Neuroinflammation	119	78,3	♀ > ♂ Surtos + graves ♀	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	O curso da doença é mais monofásico em pc soro negativos
Jiao et al., 2013. Neurology	163	67	>♀ do que ♂ nos anti-AQP4 6:1	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4+	Taxa de recaída, evolução da incapacidade e outras características clínicas não diferiram significativamente nos anti-AQP4+ e anti-AQP4-
Yang et al., 2013. Neurosci.	53	73,6	♀ > ♂	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4	+ frequente e + grave em pc anti-AQP4+	NMO + grave em pc anti-AQP4: AQP4+ (3,2); AQP4- (2,5)	A presença do anticorpo anti-AQP4 foi mais comum em ♀, se mostrando um fator preditivo de gravidade na NMO

Quadro 6: Principais estudos que correlacionam a positividade do anticorpo com o curso da NMO.

3.3 O PAPEL DAS CÉLULAS T E SUAS RESPECTIVAS CITOCINAS NA ETIOPATOGENESE DA NMO

Além do envolvimento de imunidade humoral, marcado sobretudo pela presença de autoanticorpos citotóxicos, as células T parecem também ter um importante papel na iniciação e na perpetuação do estado de autoagressão na NMO, posto que as ações das células B são amplamente dependentes das diferentes subpopulações de células T e de suas citocinas (ROMAGNANI, 2014). Em modelos experimentais onde se tentou induzir NMO em animais mediante a injeção de anticorpos anti-AQP4 extraídos de pacientes com NNO, a indução de uma doença “NMO-like” só é possível mediante a inoculação prévia de linfócitos T encefalitogênicos específicos para proteína básica de mielina, oriundos de outros animais com encefalomielite alérgica experimental (EAE) (KRISHNAMOORTHY et al., 2006).

Já a entrada de linfócitos T específicos para antígenos do sistema nervoso central no interior deste tecido sem uma prévia ruptura da BHE só pode ser bem entendida se houver um tráfico normal de células T entrando e saindo de dentro do SNC. Os experimentos clássicos com encefalomielite alérgica experimental (EAE) revelaram que quando as células T CD4⁺ específicas para a proteína básica de mielina (MBP) são injetadas no peritônio de ratos, elas podem ser encontradas no interior do SNC dos animais apenas 12 horas após a inoculação, com as alterações neurológicas se desenvolvendo entre 4 a 5 dias após (SWANBORG, 2001). Foi relatado ainda que linfócitos T ativados podem ter livre acesso ao interior do CNS, mesmo quando esta ativação for feita por antígenos não relacionados àquele tecido, sugerindo que o fluxo de células imunoreativas que entram e deixam o sistema nervoso pode ser maior do que sempre se imaginou (SMORODCHENKO et al., 2007; WESTLAND et al., 1999).

Com efeito, o fluxo contínuo de células T e monócitos dentro SNC tem sido amplamente confirmado (BECHMANN et al., 2001; HICKEY, 2001) com a identificação de várias rotas alternativas de entrada e saída de células, o que faz crer que a BHE não tenha, à princípio, sido projetada para manter os leucócitos inteiramente fora do tecido do SNC como foi, por tanto tempo, apregoado pelos patologistas (MEDAWAR, 1948, RANSOHOFF; KIVISAKK; KIDD, 2003; ENGELHARDT et al., 2005).

Da mesma forma, a hipótese de que os antígenos cerebrais deveriam ficar retidos dentro do crânio devido à ausência de vasos linfáticos, também foi gradativamente deixada de lado, uma vez que foi demonstrada a fuga de moléculas solúveis de dentro do crânio para a mucosa nasal e em seguida para os linfonodos cervicais, através dos nervos olfatórios e da lâmina cribriforme (CSERR; KNOPF, 1992; WELLER et al., 1996) (Figura 13).

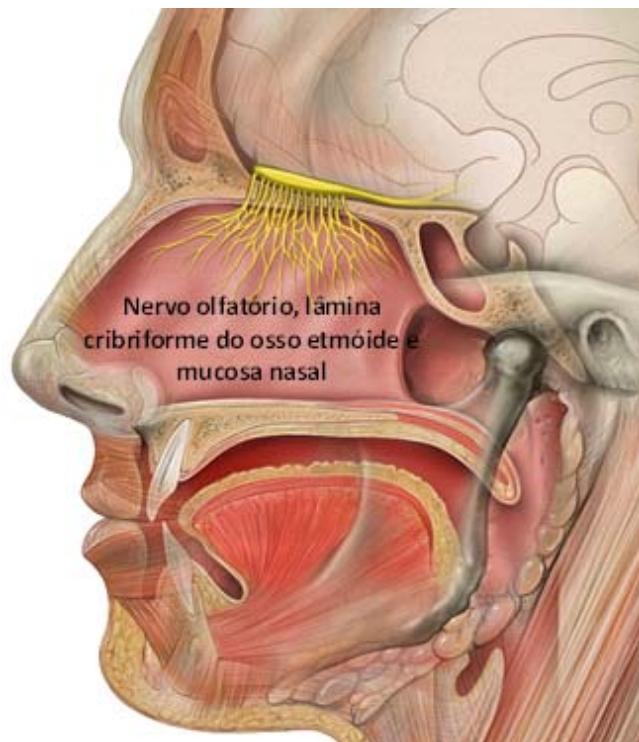


Figura 13: O possível caminho das células do sistema imune do encéfalo para a periferia (Antunes – Atlas de Anatomia. 4ª Ed)

Através de técnica de fluorescência, foi possível observar um trajeto semelhante para linfócitos T ativados oriundos de lesões ou dos ventrículos laterais, uma vez que essas células podem rapidamente ser encontradas nos linfonodos cervicais (GOLDMANN et al., 2006).

Assim, o fluxo regular de células mononucleares no SNC tem sido visto como um processo normal (fisiológico) dentro das operações internas do sistema imune (HICKEY, 1999; ENGELHARDT, 2006). Este *turnover* de células imunitárias para o tecido do sistema nervoso vem sendo estudado há muitos anos, passando a

ser mais bem compreendido após a aquisição dos anticorpos monoclonais, como o anti- α 4 integrina (Natalizumabe), cujo efeito primário é o de interferir com a transmigração de células T do interior dos vasos sanguíneos para os tecidos (YEDNOCK et al., 1992; COISNE et al., 2009).

Pohl e cols. (2011) induziram células T específicas para o receptor AQP4 em ratos Lewis e avaliaram o seu papel patogênico na presença e na ausência de autoanticorpos anti-AQP4 provenientes de pacientes com NMO. Eles demonstraram que as células T específicas induzem inflamação no cérebro dos animais, tendo como principal alvo as células astrogliais limitantes que permitem a entrada dos anticorpos patogênicos anti-AQP4 e induzem lesões semelhantes às da NMO no cérebro e na medula espinhal. Além do mais, a transferência de células T aquaporina-4 específicas provocou leve miosite (subclínica) e nefrite intersticial. Os autores demonstraram ainda que a expressão conformacional dos epitopes reconhecidos pelos anticorpos anti-AQP4 é induzida nas células renais através de citocinas pró-inflamatórias, como o Interferon-gama. Os trabalhos destes autores têm proporcionado ainda as bases para a hipótese de que as lesões de NMO são o resultado de uma combinação de fatores envolvendo as células T e a resposta imune humoral contra aquaporina-4, como pode ser visto (LINHARES et al., 2013a) (Figura 14).

também pelo conjunto de citocinas produzido pelas diferentes subpopulações de células T que se diferenciam após deixar o timo. A grande plasticidade biológica das células T faz com que o delicado equilíbrio entre as diferentes subpopulações dessas células possa se deslocar no sentido de uma população específica, na dependência de fatores estimuladores externos e internos, como os PAMPS (padrões moleculares associados aos patógenos) (MATSUYA et al., 2011; CHEN, et al., 2015) e DAMPs (padrões moleculares associados aos danos teciduais) (KANG, et al., 2015).

Esta ativação e a diferenciação das células T CD4⁺ em diferentes subpopulações fenotípicas é extremamente dependente do reconhecimento, por parte de seus receptores de antígenos (TCR), de peptídeos acoplados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (HLA) de classe II expressas na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC), e particularmente do grau de maturidade das células dendríticas (DCs), conforme pode ser visto na figura abaixo, onde se observa a dependência da diferenciação das células T virgens do estado de diferenciação das células dendríticas e de suas citocinas. Vê-se ainda (Figura 15) que, a grande plasticidade biológica entre as células Th1, Th2 e Th17 pode reverter o seu processo de diferenciação, na dependência das citocinas presentes no microambiente onde está se desenrola, ou ainda garantir a diferenciação com a produção de autocrinas (Figura 15).

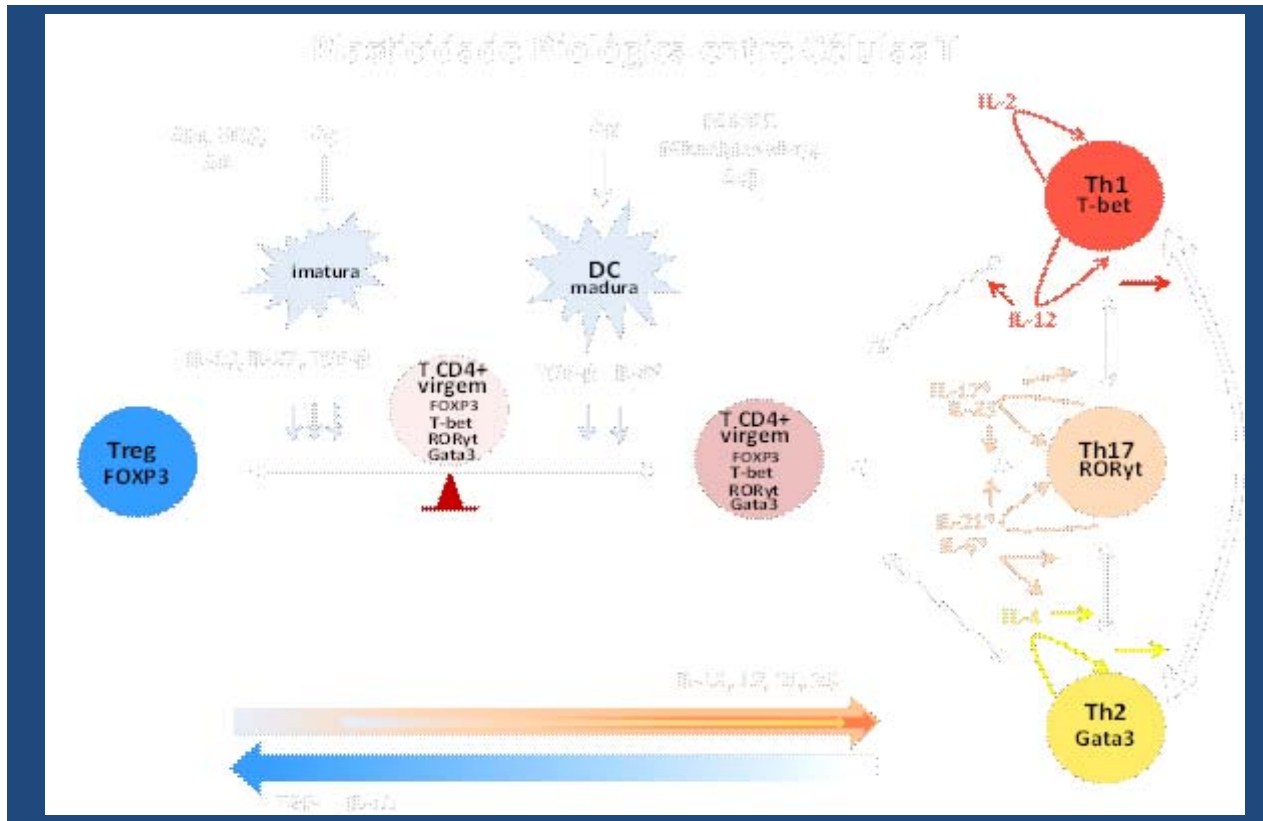


Figura 15: Plasticidade biológica entre as subpopulações células T e a dependência destas ao grau de maturidade das células dendríticas (LINHARES, 2013b).

A despeito da identidade antigênica dos alelos de HLA ainda não ter sido devidamente identificada, as análises dos TCRs realizadas em pacientes japoneses têm revelado uma expansão preferencial de poucas famílias de TCR ($V\beta 1$ e $V\beta 13$) na população de células T encefalitogênicas (WARABI et al., 2006), sugerindo que a gênese das lesões esteja restrita a um número limitado de autoepítotos, entre eles, os presentes na própria molécula de AQP4.

Trabalhos experimentais realizados com ratos revelaram que as células T específicas para determinantes de AQP4 são capazes de dirigir suas ações para os astrócitos perivasculares e periventriculares, determinando, após induzir inflamação e a subsequente entrada de anticorpos para dentro do tecido do SNC (cérebro e medula espinhal), uma doença semelhante à NMO (POHL et al., 2011).

A indução de células T *helper* e células T reguladoras exigem encontros diretos entre as células T virgens e células dendríticas (DCs). A ativação das células T e a proliferação, em ambas as situações, é dependente da dinâmica das interações instrutivas entre as células T e as DCs. Assim, por exemplo, os contatos entre as células T virgens e DCs são mais estáveis durante a indução das células T *helper* do que durante a indução das células tolerogênicas (KUSHWAH et al., 2011).

No entanto, o tempo necessário aos diferentes tipos de resultados funcionais continua a ser uma questão em debate (HUGUES et al., 2006). Na ausência de qualquer sinal inflamatório, o destino mais provável das células T, que reconhecem peptídeos apresentados pelas DCs, é entrar em profundo estado de anergia (HUGUES et al., 2006). Portanto, a ativação eficiente das células T depende normalmente da ativação prévia das células DCs por produtos microbianos, particularmente os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), que são reconhecidos por diferentes tipos de receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRR), como com, por exemplo, os da família de receptores do tipo Toll (TLRs) (WATTS et al., 2007).

As DCs, tanto de origem mielóide (mDC) quanto plasmocitóide (pDC), surgem de precursores da medula óssea que normalmente fazem *homming* em diferentes órgãos e tecidos (BONASIO et al., 2006). Essas DCs residentes encontram-se primariamente em estado de imaturidade e incapacitadas de ativar células T virgens (HUGUES et al., 2006). Entretanto, a exposição aos diferentes estímulos inflamatórios, tais como os agonistas de TLR, transformam as DCs em APCs eficientes. As mDCs e pDCs podem usar diferentes PRRs para captar os “sinais de perigo”. Assim, nas pDCs, por exemplo, a expressão de níveis elevados de TLR-7 e TLR-9 possibilita-as a responder à motivos presentes em nucleotídeos expressos nas fitas de RNA virais e a DNA bacteriano respectivamente (CAO; LIU, 2007). Em contrapartida, outros membros da família TRL, como o TRL4, são expressos em grandes quantidades nas mDCs, reconhecendo PAMPs de natureza glicolipídicas, polissacarídicas ou glicopolissacarídicas, tais como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas (WATTS et al., 2007). Recentemente Linhares e cols. (2013a) demonstraram a existência de elevados níveis de LPS no sangue periférico de pacientes com NMO em período de remissão clínica. A origem dessas moléculas ainda não está clara, mas os autores discutem a

possibilidade de isso estar relacionado às infecções urinárias recorrentes dos pacientes ou ainda ser o resultado de translocações de bactérias de origem intestinal.

Esses mesmos autores demonstraram ainda que a proliferação de células mononucleares periféricas dos pacientes se dá de forma mais intensa quando estas são tratadas com a *Echerichia coli*, se comparadas a outras bactérias (Figura 16).

Tabela 1: Análise comparativa da proliferação *in vitro* das células mononucleares periféricas de pacientes com NMO e indivíduos normais frente a diferentes patógenos.

	Controle1	NMO2
Índice de estimulação		
C. albicans	4,57 ± 2,35	5,78 ± 1,75
S. aureus	3,55 ± 2,96	2,37 ± 2,61
E. coli		
CSMP	3,75 ± 2,15 ^(*)	9,96 ± 3,07 ^{(*) (#)}
CMSP livres de células CD4	NA	3,01 ± 1,11 ^(#)
CMSP livres de células CD19	NA3	9,07 ± 3,45
CMSP livres de células CD8	NA	7,77 ± 4,22

Fonte: (LINHARES et al., 2013a)

Figura 16: proliferação *in vitro* de pacientes NMO e indivíduos normais

Uma resposta semelhante pôde ser obtida no que diz respeito à proliferação celular e à produção de IL-17, em culturas tratadas com LPS e E. coli, com respostas mais exuberantes sendo observada em ambos os casos nas culturas tratadas com a E. coli (Figura 17).

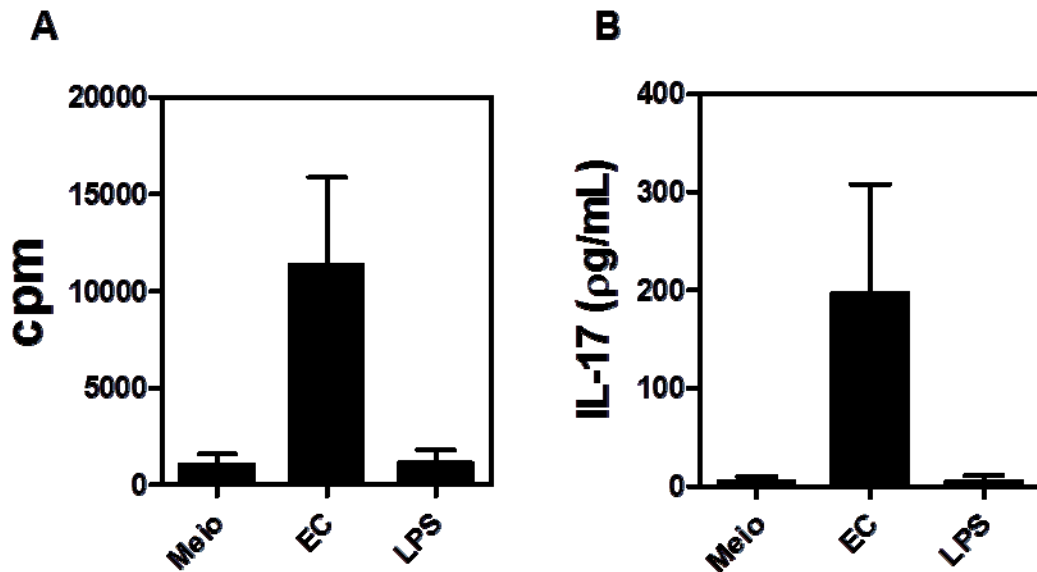


Figura 17: Proliferação celular e produção de IL-17 em culturas de CMSP de pacientes com NMO em resposta ao LP -Culturas de CMSP (1×10^6 /mL) obtidas de pacientes com NMO (n=20) foram ativadas tanto com 5×10^5 UFC/mL de *E. coli* ou com LPS (100 μ g/mL). Após 5 dias, a proliferação celular, avaliada através da captura de timidina, e a produção de IL-17, determinada pelo ELISA, foram conduzidas (LINHARES, 2013a).

A expressão diferencial desses receptores pode ter grande impacto na dinâmica das respostas imunes mediadas pelos linfócitos T contra diferentes estímulos antigênicos.

A ativação eficiente das células T virgens pelas DCs maduras, também chamadas de DCs imunogênicas, depende não apenas da apresentação de peptídeos antigênicos, mas também das interações cognitivas entre moléculas coestimuladoras, tais como os membros da família B7 (B7-1/CD80 ou B7-2/CD86), expressos na superfície das DCs ativadas e as moléculas de CD28, expressas na superfície dos linfócitos T virgens. Esses sinais são fundamentais para que as células T produzam IL-2 e subsequentemente proliferem (SU-YI et al., 2005).

Outra importante alteração fenotípica das células T ativadas pelas DCs é o aumento na expressão de moléculas de adesão, como a integrina VLA-4 (Very Late Antigen-4), envolvida nos processos de transmigração dos linfócitos do sangue para as áreas lesadas (YEDNOCK et al., 1992; COISNE et al., 2009).

Muito do conhecimento acumulado acerca da dinâmica de entrada das células T no parênquima cerebral tem sido adquirido através dos estudos utilizando anticorpos monoclonais (mAb) anti- β 4 integrina (Natalizumabe), cujo principal efeito primário é o de interferir com a transmigração das células T do interior dos vasos

sanguíneos para os tecidos (YEDNOCK et al., 1992; COISNE et al., 2009), bloqueando a interação do VLA-4 com a molécula de adesão pertencente a superfamília das imunoglobulinas, o VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein), a qual é expressa sobre o endotélio vascular (LASSMANN et al., 1991; MILLONI et al., 2010).

No local das lesões, as células T participam ativamente no processo inflamatório, seja diretamente, através suas funções citotóxicas, seja indiretamente, pela secreção de um conjunto de citocinas envolvidas na coordenação dos diferentes eventos imunológicos que se desenrolam no local (KLEINWIETFIELD; HAFLER, 2014). A diferenciação dos linfócitos T, particularmente as células T CD4⁺ virgens em diferentes fenótipos capazes de secretar padrões alternativos de citocinas é extremamente dependente de fatores solúveis (citocinas), produzidas pelas DCs durante a formação das suas sinapses imunológicas com as células. Desta forma, a secreção de IL-12 pelas DCs mielóides induz a diferenciação de células T CD4⁺ em linfócitos T auxiliar 1 (Th1 – *T helper 1*) (FAZILLEAU et al., 2007). Esta diferenciação ainda é dependente da indução do fator de transcrição T-bet (*T-box transcription factor*) (ZHU, 2010) nas células T. Esse fenótipo (Th1) é responsável pela secreção de quantidades significativas de IL-2 e interferon IFN- γ , os quais ativam fagócitos, células NK (*natural killer*) e os linfócitos T CD8⁺. O IFN- γ aumenta não apenas o poder microbicida dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos) e a função lítica das células NK, mas também induz os linfócitos B humanos a produzirem as subclasses IgG1 e IgG3 de imunoglobulinas (MCKINSTRY; STRUTT; SWAIN, 2010). A resposta imune celular induzida pelas células Th1 é fundamental para o combate às infecções causadas por parasitas intracelulares obrigatórios ou facultativos (bactérias ou protozoários; ademais, por auxiliar as células T CD8⁺, os linfócitos Th1 são também essenciais na resposta às infecções virais (HUGUES et al., 2006).

Os linfócitos T CD8⁺ são ativados através do reconhecimento de antígenos peptídicos apresentados via MHC de classe I pelas pCDs (CARBONE; HEATH, 2003). Uma vez ativados, esses linfócitos adquirem classicamente uma função citotóxica, sendo então capazes de conduzir as células infectadas à morte por apoptose, através da secreção coordenada dos produtos estocados nos seus grânulos citoplasmáticos, tais como as granzimas e as perforinas (COQUERELLE;

MOSER, 2010). Como os linfócitos T citotóxicos (CTLs) também secretam citocinas, como o IFN- γ , esses linfócitos são capazes de potencializar as respostas Th1, sendo assim também chamados de Tc-1 (OBAR; LEFRANÇOIS, et al., 2010).

Por outro lado, a presença de níveis elevados de IL-4, os linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em Th2, através da indução de um programa de diferenciação envolvendo o fator de transcrição GATA-3 (do inglês: *trans-acting T-cell-specific transcription factor*) (ZHU; YAMANE; PAUL, 2010). Esses linfócitos medeiam resposta imune humoral através da secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 permitindo assim a ativação dos linfócitos B produtores de IgE (ZHU; YAMANE, 2010). Os linfócitos Th2 estão envolvidos no combate às infestações por helmintos e na patogênese das reações de hipersensibilidade do tipo I (MAKANI; JEN; FINN, 2008; ZHU et al., 2010).

Mais recentemente, a secreção das citocinas IL-6 e IL-23 pelas DCs maduras têm sido relacionadas à diferenciação de células de fenótipo Th17 em seres humanos, através da indução de fatores de transcrição como ROR-C (GUTCHER; BECHER, 2007). Citocinas como IL-6 e IL-1 β são fundamentais na ativação dos programas genéticos envolvidos na diferenciação Th17, induzindo a expressão de receptores para IL-23 sobre as células T de memória. Embora a IL-23 tenha sido considerada inicialmente como uma citocina importante para a diferenciação das células Th17, esta função logo foi descartada, já que o seu receptor (IL-23R), presente na superfície da maioria das células T de memória e nas células T ativadas, não é observado sobre as células T virgens (KASTELEIN, HUNTER; CUI, 2007).

Assim, ficou claro que, embora a IL-23 não fosse a responsável direta pela diferenciação das células Th17 inflamatórias, ela era essencial para que isto ocorresse de forma sustentada, sendo importante ainda para o completo amadurecimento do potencial inflamatório dessas células (MCGEACHY et al., 2007).

Os linfócitos Th17 foram definidos inicialmente como uma subpopulação de células T CD4⁺ que tinha a IL-17 (IL-17A) como assinatura imunológica (AGGARWAL et al., 2003). Os estudos subsequentes revelaram que os linfócitos Th17 fabricavam também IL-6, IL-22 (LIANG et al., 2006) e a sua própria IL-21 que associada ao TGF β é capaz de induzir à diferenciação de novos clones de células Th17, através de importantes alças de retroalimentação positiva que contribuíam para a sustentação da diferenciação deste fenótipo (Figura 18).

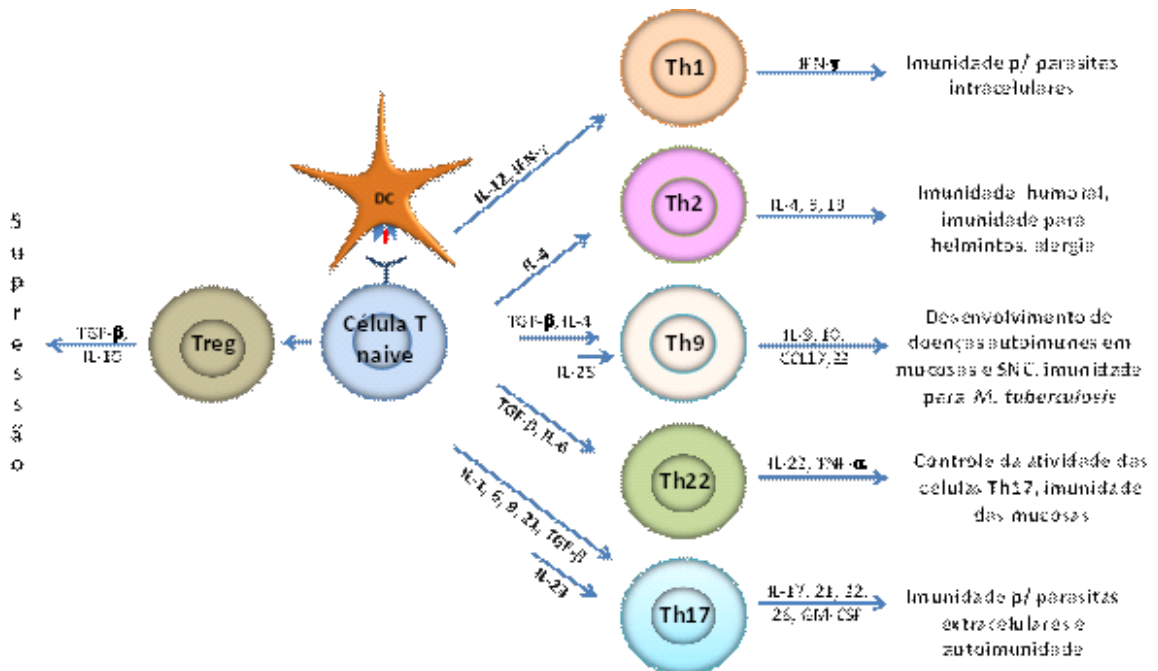


Figura 18: Diferenciação de células T CD4+ "naive". A diferenciação das diferentes subpopulações de células T a partir de precursores indiferenciados (naive) é um processo complexo que depende da ação combinada de várias citocinas, como mostrado na figura. Entretanto, outros mediadores, como o SOCS1 e SOCS2 (não mostrados) também parecem ser essenciais nas diferentes etapas destas diferenciações (LINHARES, 2013b).

Assim, dentre as principais subpopulações de linfócitos T helper intervenientes na resposta imune (Th1, Th2, Th9, Th17 e Th22), tem sido possível observar um claro desvio no sentido da subpopulação Th17 e de suas citocinas. Tal desvio tem sido relatado não somente por pesquisadores do nosso grupo (LINHARES, 2013a), mas também por outros autores, como Ishizu e cols em 2005, demonstraram uma ativação do eixo IL-17/IL8 no líquido de pacientes em surtos de NMO.

Num estudo conduzido por Wang e cols. (2011), a frequência de células T (CD4+ ou CD8+) produtoras de IL-17 foi positivamente relacionada à produção sistêmica de IL-23 no sangue periférico, tanto de pacientes com EM quanto de NMO em períodos de surtos (WANG et al., 2011b).

O envolvimento do fenótipo Th17 também foi descrito por MIHARA e cols., em 2012, quando destacaram a ativação do mesmo eixo IL-17/IL-8 no líquido dos

pacientes com NMOR durante as crises de mielite transversa (ISHIZU et al., 2005). Este dado é extremamente relevante, considerando que pode explicar a elevada infiltração de neutrófilos detectada em mais de 60% das medulas espinhais de pacientes com NMO que morreram e foram necropsiados (KIRA, 2011a). O recrutamento de neutrófilos pode contribuir para o dano local, através da produção e liberação de substâncias tóxicas, tais como as metaloproteinases, elastases e radicais livres derivados do oxigênio, contribuindo para a destruição da neuroglia local e aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica (KIRA, 2011a). No estudo anteriormente citado realizado por Ishizu e cols. (2005), os níveis IL-8 e IL-17 se relacionaram diretamente com a extensão das lesões medulares. Em contrapartida, Uzawa e cols. (2010) demonstraram haver uma correlação direta entre a intensidade das lesões medulares e os níveis séricos e líquóricos de outra citocina, desta feita com a IL-6. Todavia, em nenhum dos dois trabalhos indicados acima houve qualquer menção a produção da IL-21, uma citocina produzida por linfócitos Th17 que participa de importantes alças de retroalimentação positivas que levam a diferenciação e a consolidação da diferenciação dos novos clones de células Th17 (Figura 3) (KORN et al., 2007; ZHOU et al., 2007).

Mais recentemente, Wang e cols. (2011) demonstraram haver altos níveis de IL-21 no soro de indivíduos com NMO, mas não nos soros de pacientes com outras doenças desmielinizantes, como a esclerose múltipla, durante o período de surto (WANG, et al., 2011). Neste estudo, contudo, os autores não verificaram a relação entre os níveis sistêmicos de IL-21 e gravidade da enfermidade. Recentemente foi relatado que a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ ativadas de pacientes com NMO durante o período de remissão apresenta uma estreita correlação positiva com a produção de IL-21 e IL-6 e a gravidade da doença, indicada pelo grau de incapacidade neurológica (EDSS) (LINHARES, 2013a).

Os aumentos relativos de produção de IL-6 e IL-21 pelas células T CD4⁺ pode contribuir para a potencialização da atividade das células B durante os períodos de surto de NMO. Spolski e cols (2009), demonstraram que a IL-21 é também por uma subpopulação em particular de linfócitos T CD4⁺, denominadas células T auxiliares foliculares, as quais estão presentes nos centros germinativos dos linfonodos, contribuem para proliferação de células B, para a troca dos isotipos das imunoglobulinas e ainda para a maturação das afinidades dos idiotipos dos

diferentes clones de linfócitos B, inclusive o de células potencialmente autoagressoras, produtoras de autoanticorpos (SPOLSKI et al., 2009).

Não obstante a presença de anticorpos anti-aquaporina-4 seja observada, em algumas séries de pacientes, na maior parte dos enfermos com NMO e ainda que alguns pesquisadores tenham encontrado uma correlação direta entre os níveis séricos destes anticorpos com extensão das lesões medulares (TAKAHASHI et al., 2007), não foi possível para outros autores observarem as mesmas relações (FUJIHARA; LEITE, 2013).

Esses dados encontram suporte nos argumentos já apresentados aqui que põem em xeque o papel dos anticorpos anti-AQP4 na imunopatogênese da NMO. Diante disso, parece clara a necessidade da presença de células T para preencher as possíveis lacunas deixadas pelos linfócitos B e os seus autoanticorpos anti-AQP4 na patogênese da NMO. Além do mais, outros autoanticorpos, de outras classes, voltados para epítopos de diferentes autoantígenos, podem estar também envolvidos na patogênese da NMO. Neste contexto, os estudos realizados por Matsuya e colaboradores (MATSUYA et al., 2011) em pacientes com NMO soropositivos demonstraram que, embora a resposta das células T para um conjunto de peptídeos derivados de AQP4 peptídeos tenha sido significativamente mais elevada nos pacientes com NMO, tanto os indivíduos saudáveis quanto os pacientes com EM também reagem da mesma forma a alguns epítopos de AQP4.

Após o quanto foi visto acima, torna-se clara a necessidade de se tentar estabelecer uma correlação precisa entre os títulos dos anticorpos anti-AQP4 e as características clínicas dos pacientes com NMO.

4 HIPÓTESE

A presença dos anticorpos anti-AQP4 estaria diretamente associada às formas mais graves da enfermidade?

5 OBJETIVO

5.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a frequência do anticorpo IgG NMO em pacientes com NMO no Rio de Janeiro e sua influência no prognóstico.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar características demográficas e clínicas entre pacientes soropositivos e soronegativos.
2. Analisar a associação da positividade do anticorpo IgG NMO com variáveis demográficas e clínicas.
3. Analisar a morbidade em 5 e 10 anos de doença de pacientes soropositivos e soronegativos.
4. Analisar a mortalidade de pacientes soropositivos e soronegativos.

6 MATERIAL E MÉTODO

6.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo observacional e retrospectivo de coorte para análise de prognóstico em pacientes com NMO.

6.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Os participantes fazem parte de uma coorte de pacientes com doenças desmielinizantes idiopáticas inflamatórias (DDII) atendidos no serviço de Neurologia do Hospital Federal da Lagoa (HFL) desde sua criação em 1985. O ambulatório para atendimento a pacientes com Esclerose Múltipla e outras doenças desmielinizantes é referência no Estado do Rio de Janeiro e atende a 75% do total de casos. Trata-se de um hospital público geral do Ministério da Saúde, de médio porte, situado na zona sul da cidade do Rio de Janeiro, região administrativa AP2 onde os pacientes são atendidos por demanda espontânea e encaminhamento de outros serviços públicos, conveniados e privados do Estado do Rio de Janeiro. A equipe neurológica é formada de neurologistas do Ministério da Saúde e docentes da UNIRIO, com especialização e treinamento específico para diagnóstico e tratamento de DDII.

A partir do reconhecimento da NMO como uma condição distinta da EM ao final da década de 90, os casos inicialmente diagnosticados como EM e que preenchiam critérios de NMO (1999) foram reclassificados. Em 2006 um novo critério de diagnóstico foi proposto para NMO (WINGERCHUK et AL., 2006), incluindo o anticorpo IgG NMO entre os critérios laboratoriais e, a seguir, foi introduzida a classificação das Síndromes do Complexo NMO, incluindo a NMO, síndromes NMO limitadas e formas óptico espinhais da EM asiática. (WINGERCHUK et al., 2007).

Entre 2009 e 2011 os neurologistas do HFL fizeram uma revisão de diagnóstico de todos os casos de DDII atendidos consecutivamente neste período (casos antigos e novos) aplicando os novos critérios de diagnóstico de NMO e também de EM (Figura 19).

DIAGNÓSTICO GERAL DAS DOENÇAS DESMIELINIZANTES

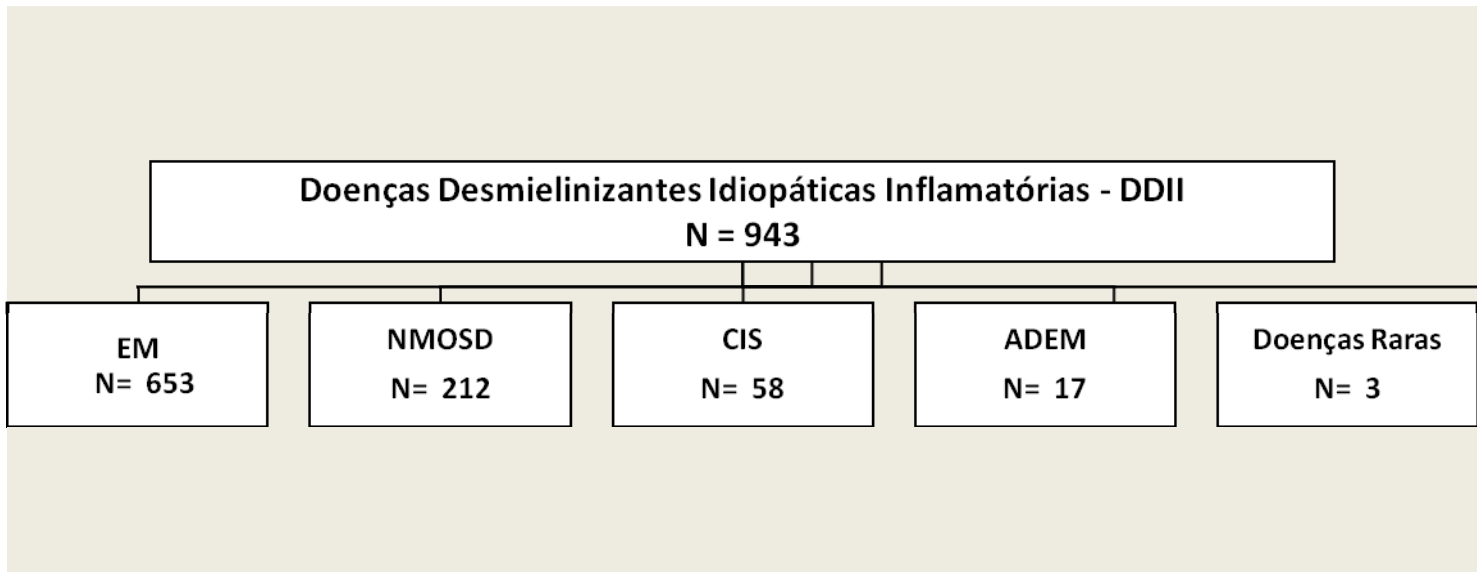


Figura 19: Espectro das doenças desmielinizantes idiopáticas no Hospital da Lagoa (EM: Esclerose Múltipla; NMOSD: Síndromes do Complexo da Neuromielite Óptica; CIS: Síndrome Clínica Isolada; ADEM: Encefalomielite Disseminada Aguda)

Para este estudo foram considerados elegíveis os casos de NMO definida pelos critérios de Wingerchuk e cols. (2006) atendidos no período de 2009 a 2011 e com testagem do anticorpo anti-AQP4. Foram excluídos pacientes com síndromes NMO limitadas, NMO sem investigação do anticorpo e a EM óptico espinhal além daqueles sem informações clínicas completas sobre a evolução clínica atualizada até março de 2015.

6.3 COLETA DE DADOS

O levantamento de dados foi realizado retrospectivamente nos registros médicos hospitalares onde está descrita a anamnese e registrados dados do exame neurológico. As informações foram colocadas planilha SPSS. O resultado do exame do anticorpo IgG NMO realizado pelo método da imunofluorescência indireta foi extraído de listas enviadas pelos laboratórios.

6.4 DEFINIÇÃO DE CASO

A NMO foi caracterizada por, no mínimo, dois eventos índices, neurite óptica (uni ou bilateral) e mielite transversa (completa ou parcial), de instalação aguda ou subaguda, ocorridos simultaneamente (no mesmo dia) ou separados entre si por dias, semanas, meses ou anos. Na presença de um evento adicional foi caracterizada a forma recorrente, Sinais clínicos de envolvimento do tronco cerebral ou cérebro não excluíram diagnóstico. Todos os pacientes apresentavam, no mínimo, dois dos três dados laboratoriais: RM normal ou não sugestiva de EM, extensa lesão na medula espinhal pela RM (> três segmentos vertebrais) e positividade do anticorpo IgG NMO (WINGERCHUK et al., 2006).

6.5 DEFINIÇÃO DOS DESFECHOS

- A morbidade da doença foi avaliada pelas sequelas neurológicas;
- Disfunção visual uni ou bilateral;
- Disfunção visual grave em pelo menos um dos olhos;
- Disfunção motora grave em um ou mais membros;
- Disfunção sensitiva grave;
- Disfunção esfinteriana grave;
- EDSS igual ou maior que 6;
- EDSS igual ou maior que 7;
- Modelo DEVIC - Disfunção visual bilateral grave (NOB) e Disfunção motora grave em um ou mais membros, tornando o paciente restrito à cadeira de rodas ou ao leito (DEVIC);
- No caso de ausência dos desfechos os casos foram censurados ao final de 5 e 10 anos de seguimento. Foi considerado o tempo entre a primeira manifestação neurológica e a instalação das sequelas;
- Mortalidade - óbito relacionado à evolução da doença, sendo computada a data constante no prontuário do paciente.

6.6 VARIÁVEIS INDEPENDENTES E DESCRITIVAS

➤ *Variáveis demográficas*

- Idade na primeira manifestação neurológica: foram anotadas a data de nascimento completa e a idade em anos na data do primeiro evento neurológico. Na análise estatística a idade foi estudada como variável contínua e dicotômica.
- Raça/Cor/Etnia: referiam-se aos dados de identificação conforme atributos adotados pelo IBGE que classifica raça/cor nas seguintes categorias: branca, preta, amarela, parda e indígena e sem informação. Na análise estatística os pacientes foram classificados em Afrobrasileiros (pretos e pardos) ou Brancos
- Presença de outras doenças imunomediadas - foi verificado o relato em prontuário das seguintes doenças autoimunes – LES, Miastenia gravis, Síndrome de Sjogren, Diabetes tipo 1, Psoríase, Colite ulcerativa.

➤ *Variáveis relacionadas ao curso clínico da NMO*

Na definição de evento foi mantida a definição de manifestação neurológica aguda indicativa de comprometimento do SNC com duração mínima de 24 horas. Considerando-se que as lesões inflamatórias na NMO são localizadas em topografias distantes no SNC (nervo óptico e medula espinhal, tronco cerebral, cérebro) cada novo evento agudo foi computado de forma independente, exceto quando ocorrendo no mesmo dia.

A classificação dos eventos neurológicos foi sindrômica: Óptico (uni ou bilateral), Medular (medular completo - motor, sensitivo e esfinteriano ou medular parcial), Óptico-medular (quando estas manifestações ocorrerem dentro de 24 horas), Tronco cerebral ou Cerebral.

- ✚ - Primeiro evento neurológico
- ✚ - Eventos índices – NO e MT
- ✚ - Intervalo entre os Eventos Índices (em meses)
- ✚ - Intervalo de tempo (em meses) entre os eventos índices que marcam a conversão de uma síndrome NMO limitada em NMO.
- ✚ - A gravidade das manifestações neurológicas at nadir, at recovery dos eventos índices e no último *follow up* foram analisadas pela escala de disfunção visual e medular desenvolvida para mensurar seqüelas da NMO.

(Wingerchuk et al.,1999) onde o escore mínimo (zero) indica exame neurológico normal e o escore máximo (7 na escala visual, 6 na escala motora, 4 na escala sensitiva e 4 na escala esfinteriana) indicam perda da função. A disfunção grave visual ou motora é indicada por escores iguais ou maiores do que 4 enquanto a disfunção grave sensitiva e esfinteriana, por escores iguais ou maiores do que 3.

6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado um estudo descritivo, utilizando a média e desvio padrão para as variáveis contínuas e a distribuição da frequência absoluta e relativa para as variáveis categóricas. O teste qui-quadrado foi utilizado para comparar grupos quanto às variáveis.

A avaliação da associação entre as variáveis demográficas e clínicas e a presença do anticorpo foi realizada pela análise bivariada, por meio de *odds ratio* (OR) brutas e ajustadas, assumindo-se intervalos de 95% de confiança.

Foi aplicado o método de Kaplan-Meier visando identificar possíveis diferenças no tempo para alcançar os desfechos (NOB, PLEGIA OU MODELO DEVIC) entre os grupos soropositivos e soronegativos. Foi considerado como censura aqueles que completaram 5 e 10 anos de seguimento livres da ocorrência dos desfechos.

O teste de *log rank* foi usado para medir a diferença do tempo para alcançar os desfechos entre os grupos.

7 RESULTADOS

7.1 COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES NMO DE ACORDO COM O IGG STATUS

Dos 48 pacientes com NMO estudados, 25 foram soropositivos para anti-AQP4 e 23 soronegativos, com média de idade na primeira manifestação neurológica da doença de 28,4 (DP \pm 13,84) anos e 35,87 (DP \pm 13,9) anos respectivamente. Considerando os grupos, o ano de início dos soropositivos foi 1999 (1976-2006) e dos soronegativos, 2002 (1983-2008) e o tempo de doença, entre soropositivos de 14 anos (4 a 39) e entre soronegativos de 11 anos (4 a 32).

As características demográficas demonstradas na tabela 1 evidenciam que somente a idade de início da doença apresentou significância estatística na comparação entre os grupos, com início mais precoce nos pacientes soropositivos.

Tabela 1: Distribuição das características demográficas segundo o IgG NMO status (Todos os pacientes)

	Anti-AQP4 (+)	Anti-AQP4 (-)	
	N (%)	N (%)	
Variável			Valor de p*
Raça/cor da pele			
Branca	8 (32,0%)	13 (56,5%)	0,145
Não branca	17 (68,0%)	10 (43,5%)	
Sexo			
Masculino	1(4,0%)	4 (17,4%)	0,180
Feminino	24 (96,0%)	19 (82,6%)	
<u>Idade ao início da doença</u>			
<u>0-30 anos</u>	<u>16 (64,0%)</u>	<u>8 (34,8%)</u>	<u>0,043</u>
<u>30 anos ou mais</u>	<u>9 (36,0%)</u>	<u>15 (62,5%)</u>	
Tempo de doença			
0-14 anos	10 (40,0%)	14 (60,9%)	0,248
14 anos ou mais	15 (60,0%)	9 (39,1%)	
Doenças imunológicas associadas			
Sim	2(8%) *	3 (13,0%)**	0,600
Não	23 (92,0%)	20 (87,0%)	

*LES, Miastenia gravis tipo 1

** Síndrome do anticorpo antifosfolípideo (2), diabetes

Na Tabela 2 nós estudamos os dados relativos às características clínicas iniciais dos 48 pacientes com NMO segundo a positividade ou não dos anticorpos anti-AQP4. Neste estudo, observamos que a NO foi a manifestação clínica mais comum nos indivíduos soropositivos (48%) contra 34,8% dos pacientes soronegativos. As manifestações encefálicas fora dos nervos ópticos, como as lesões de tronco cerebral e encefalopatias foram da mesma forma mais comuns nos pacientes soropositivos (Tabela 2). Em contrapartida, 60,9% dos pacientes soronegativos desenvolveram inicialmente mielite transversa (MT), se comparado aos 28% dos pacientes soropositivos. Apesar de manifestações como a neurite óptica e mielite transversa terem se mostrado diferentes entre os dois grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.

O mesmo pode ser dito com relação ao tipo de evento índice. Apesar de não ter sido possível identificar diferenças estatisticamente significativas, observamos uma maior tendência à NO, no grupo soropositivo (56,0%) e à MT no grupo soronegativo (60,9%) (Tabela 2).

No que diz respeito aos intervalos de tempo entre os eventos índices, também não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos nos intervalos considerados, dados pela mediana (10 meses), (Tabela 2).

Com relação ao evento índice visual, ambos os grupos apresentaram uma frequência maior de NO bilateral, sem que, contudo, tivesse sido possível observar diferenças significativas entre os grupos soropositivo e soronegativo (Tabela 2).

Sobre o evento índice medular, a MT completa foi mais frequente (73,9%) nos pacientes soronegativos, contra 60% dos pacientes soropositivos. Apesar da diferença, está também não se mostrou estatisticamente significativa (Tabela 2).

Quando analisamos as disfunções neurológicas *at nadir* e *at recovery*, não foi possível observar qualquer diferença significativa entre os grupos soropositivo e soronegativo no que diz respeito às funções visuais, sensitivas, motoras e esfinterianas após o primeiro surto (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das características clínicas segundo o status IgG-NMO

Variável	IgG-NMO + N = 25 (%)	IgG-NMO - N = 23 (%)	P	OR (95%CI)
Manifestação inicial				
Neurite óptica (NO)	12 (48,0)	8 (34,8)	0,133	-
Mielite transversa (MT)	7 (28,0)	14 (60,9)		
Óptico medular (OMT)	1 (4,0)	0 (0,0)		
Síndrome de tronco cerebral	3 (12,0)	1 (4,3)		
Encefalopatia	2 (8,0)	0 (0,0)		
Evento Índice (EI)				
NO	14 (56,0)	9 (39,1)	0,129	-
MT	9 (36,0)	14 (60,9)		
OMT	2 (8,0)	0 (0,0)		
Intervalo entre os EIs (meses)				
≤ 10 meses	13 (52,0)	12 (52,2)	0,990	0,993 (0,320-3,085)
> 10 meses	12 (48,0)	11 (47,8)		
EI visual				
NO bilateral	14 (56,0)	12 (52,2)	0,790	1,167 (0,374-3,637)
NO unilateral	11 (44,0)	11 (47,8)		
EI medular				
MT Completa	15 (60,0)	17 (73,9)	0,307	0,529 (0,155-1,806)
MT Parcial	10 (40,0)	6 (26,1)		
Disfunção visual "at nadir"				
Escore ≥ 4	22 (88,0)	20 (87,0)	0,913	1,100 (0,199-6,088)
Escore < 4	3 (12,0)	3 (13,0)		
Disfunção visual "at recovery"				
Escore ≥ 4	12 (48,0)	12 (52,2)	0,773	0,846 (0,272-2,629)
Escore < 4	13 (52,0)	11 (47,8)		
Disfunção motora "at nadir"				
Escore ≥ 4	14 (56,0)	14 (60,9)	0,732	0,818 (0,259-2,587)
Escore < 4	11 (44,0)	9 (39,1)		
Disfunção motora "at recovery"				
Escore ≥ 4	22 (88,0)	20 (87,0)	0,913	1,100 (0,199-6,088)
Escore < 4	3 (12,0)	3 (13,0)		
Disfunção sensitiva "at nadir"				
Escore ≥ 4	6 (24,0)	8 (34,8)	0,412	0,592 (0,169-2,080)
Escore < 4	19 (76,0)	15 (65,2)		
Disfunção sensitiva "at recovery"				
Escore ≥ 4	1 (4,0)	0 (0,0)	0,332	0,511 (0,386-0,676)
Escore < 4	24 (96,0)	23 (100,0)		
Disfunção esfinteriana "at nadir"				
Escore ≥ 3	8 (32,0)	7 (30,4)	0,907	1,076 (0,317-3,653)
Escore < 3	17 (68,0)	16 (69,6)		
Disfunção esfinteriana "at recovery"				
Escore ≥ 3	3 (12,0)	2 (8,7)	0,708	1,432 (0,217-9,444)
Escore < 3	22 (88,0)	21 (91,3)		

Na tabela 3, nós analisamos a distribuição das características clínicas no último “*follow up*” segundo a positividade ou negatividade dos anticorpos anti-AQP4.

No que diz respeito à disfunção visual, a neurite óptica bilateral foi mais comum nos pacientes soropositivos, acometendo 15 dos 25 pacientes estudados (60%), se comparado aos 21,7 % dos pacientes soronegativos (5 de 23). Já as lesões visuais unilaterais foram mais comuns entre os pacientes soronegativos atingindo 18 dos 23 pacientes estudados. As diferenças entre os dois grupos estudados mostram-se bastante consistentes, com elevado nível de significância ($p=0,007$) (tabela 3).

Também se mostraram significantes ($p=0,03$) as diferenças relacionadas à gravidade das disfunções visuais observadas nos dois grupos estudados. Oitenta e oito por cento (22 de 25) dos pacientes soropositivos apresentaram um “escore” maior ou igual a 4, contra 60% (14 de 23) dos pacientes soronegativos que apresentaram “escore” semelhante (Tabela 3).

No que concerne à gravidade das disfunções motoras, estas se mostraram, da mesma forma, mais significativas entre os pacientes soropositivos. Sessenta e quatro por cento destes pacientes teve um “escore” igual ou maior do que 4. Em contrapartida, 78% (18 de 23) dos pacientes soronegativos. A comparação efetuada entre os dois grupos demonstrou claramente uma maior gravidade no que diz respeito à gravidade das disfunções motoras no grupo de pacientes soropositivos ($p=0,003$), havendo menos de 1% de chance de os resultados terem sido obtidos casualmente (Tabela 3).

Resultados semelhantes foram obtidos com relação a disfunção esfínteriana com $p=0,025$, para um “escore” igual ou maior do que 3; e para as disfunções sensitivas, com $p=0,05$, para um “escore” igual ou superior a 4 para as disfunções mais graves (Tabela 3).

Quando utilizamos EDSS como forma de avaliação das disfunções neurológicas e admitimos os graus maior ou igual a 6 ou maior ou igual a 7 (Tabela 3, indicativos de maior gravidade, foi possível observar valores de “p” extremamente significativos, próximos de zero, o que indica mais uma vez que a presença dos anticorpos anti-AQP4 contribui significativamente para a maior gravidade da NMO. Com o fito de juntar num mesmo grupo os principais parâmetros indicativos de gravidade na NMO, criamos o chamado Modelo Devic, visto que a escala EDSS não contempla um dos dois principais “eventos índices” da neuromielite óptica, isto é, a

neurite óptica. Assim, agrupamos dentro do Modelo Devic os valores mínimos correspondentes aos maiores graus de disfunção neurológica dentro das diferentes escalas e comparamos os resultados nos dois grupos de pacientes (soropositivos e negativos). Assim, foi possível demonstrar que os enfermos que apresentavam maiores disfunções neurológicas globais eram justamente os do grupo soropositivos, com o valor de “p” próximo de zero (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das características clínicas na última avaliação de acordo com a positividade do anticorpo

Variável	IgG-NMO + N = 25 (%)	IgG-NMO - N = 23 (%)	P	OR (95%CI)
Disfunção visual				
NO bilateral	15 (60,0)	5 (21,7)	0,007	5,400 (1,511-19,297)
NO unilateral	10 (40,0)	18 (78,3)		
Gravidade da disfunção visual				
Escore ≥ 4	22 (88,0)	14 (60,9)	0,030	4,714 (1,086-20,472)
Escore < 4	3 (12,0)	9 (39,1)		
Gravidade da disfunção motora				
Escore ≥ 4	16 (64,0)	5 (21,7)	0,003	6,400 (1,772-23,110)
Escore < 4	9 (36,0)	18 (78,3)		
Gravidade da disfunção sensitiva				
Escore ≥ 4	6 (24,0)	1 (4,3)	0,054	6,947 (0,767-62,964)
Escore < 4	19 (76,0)	22 (95,7)		
Gravidade da disfunção esfinteriana				
Escore ≥ 3	12 (48,0)	4 (17,4)	0,025	4,385 (1,156-16,636)
Escore < 3	13 (52,0)	19 (82,6)		
EDSS				
≥ 6,0	16 (64,0)	4 (17,4)	0,001	8,444 (2,184-32,658)
< 6,0	9 (36,0)	19 (82,6)		
EDSS				
≥ 7,0	15 (60,0)	2 (8,7)	0,000	15,750 (3,005-82,542)
< 7,0	10 (40,0)	21 (91,3)		
Modelo DEVIC				
Visual bilateral e motora graves	13 (52,0)	1 (4,3)	0,000	23,833 (2,770-205,043)
Outros	12 (48,0)	22 (95,7)		

Na Tabela 4, nós comparamos os pacientes que desenvolveram o Modelo Devic aos demais pacientes. Quatorze dos quarenta e oito pacientes estudados preencheram o Modelo Devic, definido por grave disfunção visual bilateral e paraplegia/tetraplegia (Tabela 4). Destes pacientes 93,0% eram mulheres e 63,0 %

afrodescendentes. Dos quatorze que atingiram o desfecho de grave disfunção motora e visual (modelo Devic), somente 1 paciente era soronegativo, com uma mediana de tempo de 11 anos de doença (mínimo de 4 e máximo de 35 anos). Comparando as características clínicas iniciais da doença não houve diferença entre os grupos, exceto quanto à gravidade da disfunção visual e esfinteriana na fase de remissão (at recovery) dos eventos índices visual e medular.

Tabela 4: Modelo DEVIC comparado aos demais pacientes

Variável	Modelo Devic N = 14 (%)	Outros N = 34 (%)	P	OR (95%CI)
Manifestação inicial				
Neurite óptica (NO)	7 (50,0)	13 (38,2)		
Mielite transversa (MT)	3 (21,4)	18 (52,9)		
Óptico medular (OMT)	0 (0,0)	1 (2,9)	0,069	-
Síndrome de tronco cerebral	2 (14,3)	2 (5,9)		
Encefalopatia	2 (14,3)	0 (0,0)		
Evento Índice (EI)				
NO	8 (57,1)	15 (44,1)		
MT	5 (35,7)	18 (52,9)	0,500	-
OMT	1 (7,1)	1 (2,9)		
Intervalo entre os EIs (meses)				
≤ 10 meses	6 (42,9)	19 (55,9)	0,412	0,592 (0,169-2,080)
> 10 meses	8 (57,1)	15 (44,1)		
EI visual				
NO bilateral	9 (64,3)	17 (50,0)	0,367	1,800 (0,499-6,496)
NO unilateral	5 (35,7)	17 (50,0)		
EI medular				
MT completa	10 (71,4)	22 (64,7)	0,653	1,364 (0,351-5,293)
MT parcial	4 (28,6)	12 (35,3)		
Disfunção visual "at nadir"				
Escore ≥ 4	14 (100,0)	28 (82,4)	0,093	1,500 (1,211-1,858)
Escore < 4	0 (0,0)	6 (17,6)		
Disfunção visual "at recovery"				
Escore ≥ 4	3 (21,4)	21 (61,8)	0,011	0,169 (0,040-0,721)
Escore < 4	11 (78,6)	13 (38,2)		
Disfunção motora "at nadir"				
Escore ≥ 4	10 (71,4)	18 (52,9)	0,238	2,222 (0,581-8,494)
Escore < 4	4 (28,6)	16 (47,1)		
Disfunção motora "at recovery"				
Escore ≥ 4	12 (85,7%)	30 (88,2%)	0,810	0,800 (0,129-4,960)
Escore < 4	2 (14,3%)	4 (11,8%)		
Disfunção sensitiva "at nadir"				

Escore ≥ 4	4 (28,6)	10 (29,4)	0,954	0,960 (0,243-3,794)
Escore < 4	10 (71,4)	24 (70,6)		
Disfunção sensitiva "at recovery"				
Escore ≥ 4	1 (7,1)	0 (0,0)	0,115	0,277 (0,174-0,439)
Escore < 4	13 (92,9)	34 (100,0)		
Disfunção esfinteriana "at nadir"				
Escore ≥ 3	6 (42,9)	9 (26,5)	0,266	2,083 (0,565-7,676)
Escore < 3	8 (57,1)	25 (73,5)		
Disfunção esfinteriana "at recovery"				
Escore ≥ 3	4 (28,6)	1 (2,9)	0,008	13,200 (1,320-132,014)
Escore < 3	10 (71,4)	33 (97,1)		

7.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Analizamos por curvas de Kaplan Meier o tempo (em anos) para pacientes soropositivos e soronegativos alcançarem o MODELO DEVIC. Entre 25 pacientes soropositivos 13 desenvolveram o modelo DEVIC (13/25 – 52,0%) e entre os soronegativos apenas 1 (1/23 – 4,34%).

Considerando o tempo total de doença, e aplicando-se o teste do Log Rank observa-se diferença estatisticamente significativa nesta distribuição ($p= 0,002$) (Figura 20).

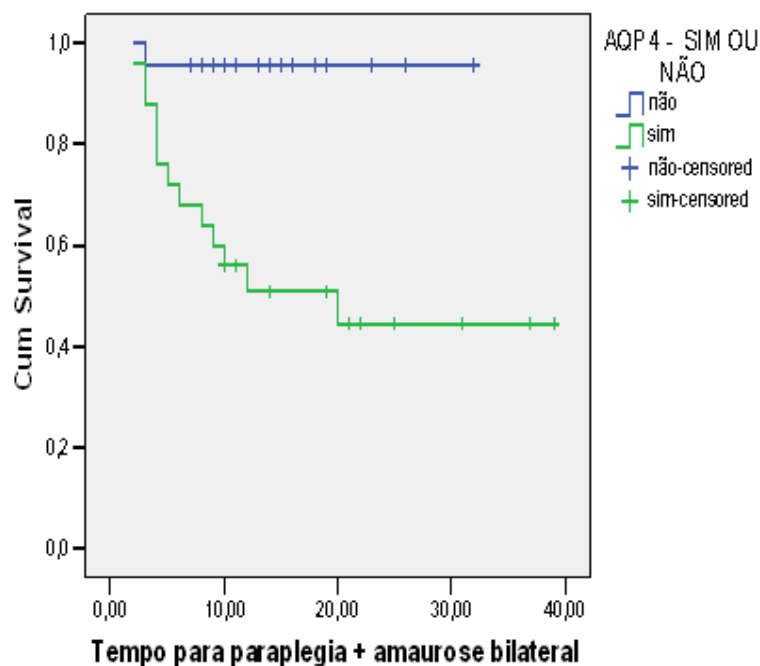


Figura 20: Curva de Kaplan Meier demonstrando o tempo total de doença para pacientes soropositivos e soronegativos alcançarem o modelo DEVIC

Considerando o tempo de doença de 5 anos, e aplicando-se o teste do Log Rank observa-se tendência nesta distribuição ($p = 0,059$). No tempo de doença de 10 anos, fica confirmado pelo Teste Log Rank a diferença entre os grupos soropositivos e soronegativos (Figura 21).

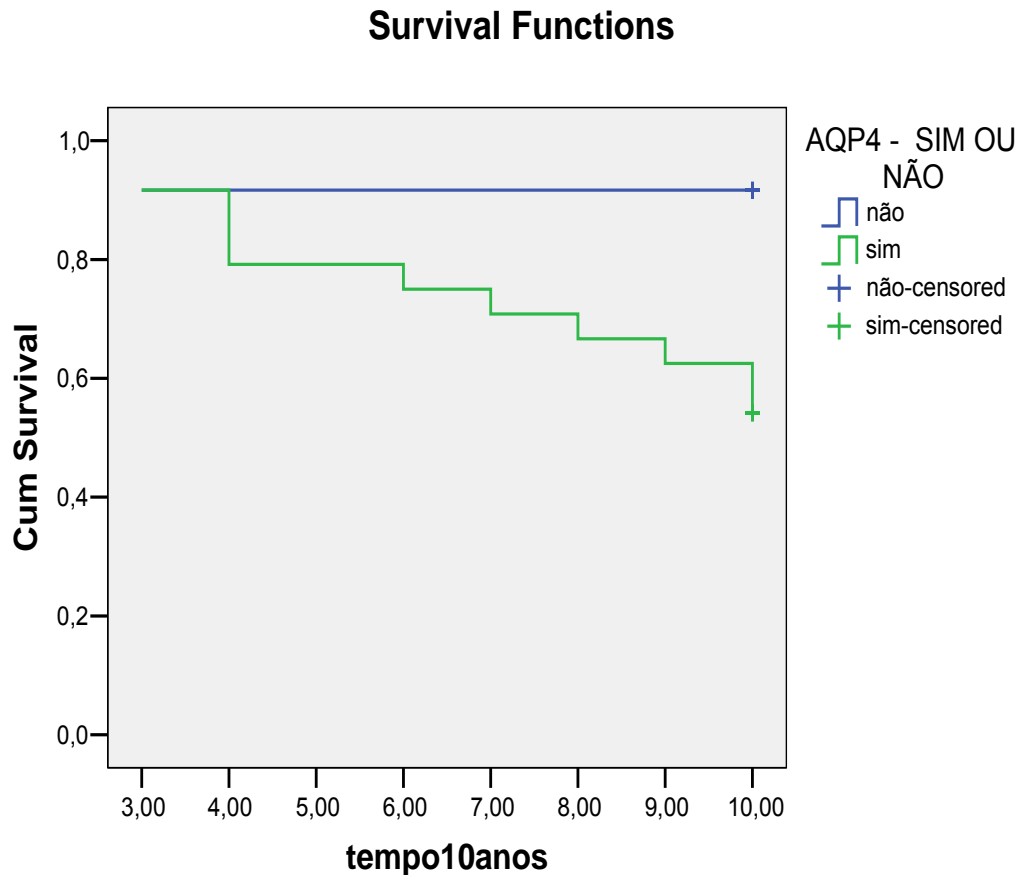


Figura 21: Curva de Kaplan Meier demonstrando o tempo (em 10 anos) para pacientes soropositivos e soronegativos alcançarem o modelo DEVIC

7.3 MORTALIDADE

Até março de 2015, 9/48 (19%) dos pacientes com NMO (88,9% mulheres e 66,7% afro brasileiras) foram ao óbito. O tempo para o óbito variou de quatro a 16 anos, com uma média de 9,88 anos e desvio padrão de 4,59 anos e uma mediana de 11 anos.

Embora a soropositividade para o anticorpo anti-AQP4 tenha sido comprovada na maioria destas pacientes (7/9) o teste Log-Rank não demonstrou diferença significativa entre os grupos ($p=0.214$).

8 DISCUSSÃO

A neuromielite óptica é uma doença autoimune que por muito tempo foi considerada como uma forma variante de esclerose múltipla. Apesar das diferenças clínicas, histopatológicas e radiológicas terem sido identificadas ao longo dos anos, a descoberta dos anticorpos anti-AQP4 em 2004 contribuiu para reforçar as diferenças entre essas duas enfermidades que a esta altura já eram consideradas como doenças distintas. Esses anticorpos, quase sempre da subclasse IgG1, ligam-se com alta afinidade sobretudo aos epitopos do terceiro domínio extracelular dos tetrâmeros das isoformas M23 de AQP4 (TANI et al., 2009; MADER et al., 2010; CRANE et al., 2011; VERKMAN et al., 2011). Essas moléculas se encontram predominantemente na forma de OAPs sobre a superfície das células, formando complexos macromoleculares com importantes estruturas do citoesqueleto, além das moléculas de EAAT2 e Kir4.1 presentes nas membranas dos pés terminais dos astrócitos das regiões de interface com o sistema liquórico (HINSON et al., 2008).

Desde a descoberta dos anticorpos anti-AQP4, a maior parte dos pesquisadores, acreditou que os anticorpos fossem essenciais ao desenvolvimento da NMO, dada as múltiplas funções da AQP4 nas células e suas implicações na fisiologia do SNC como um todo. Embora essa hipótese se mostrasse tentadora, ela ia de encontro às observações dos casos de NMO, muito bem estabelecidos segundos os critérios de Wingerchuk e cols. (2006), que se mantinham soronegativos ao longo de toda a evolução de enfermidade. Da mesma forma intrigante, eram os casos de pacientes que apresentavam outras doenças autoimunes, eram soropositivos para anti-AQP4 e apresentavam manifestações neurológicas.

Um dos principais objetivos deste trabalho é estudar numa coorte de pacientes provenientes do Centro de Referência em Esclerose Múltipla do Rio de Janeiro, a positividade dos anticorpos anti-AQP4 em pacientes com NMO e a sua correlação com as características demográficas e clínicas dos pacientes, tais como o prognóstico, a mortalidade e morbidade da doença nestes enfermos.

Em nossa série, não houve correlação entre a soropositividade e o sexo, a raça, o tempo de evolução da doença e a presença de co-morbidades autoimunes, ao contrário de vários trabalhos (tabela 1) onde foi possível observar uma correlação positiva entre a soropositividade e o sexo feminino.

O dado mais interessante da primeira fase das análises foi demonstração da correlação positiva entre a soropositividade e a idade dos pacientes; havendo alto grau de significância da positividade (0,043) em pacientes mais jovens (0 – 30 anos). Os motivos para isto não nos parecem muito claros. Sabe-se que doenças autoimunes são mais frequentes em pessoas mais velhas do que a faixa de idade apresentada pelos pacientes soropositivos. Isto poderá estar relacionado diretamente aos fatores que levam a ruptura inicial da barreira hematoencefálica e a quebra de tolerância aos autoantígenos do SNC. Todavia, isto não passará apenas do terreno especulativo.

Outro dado que chamou a atenção em nossos resultados é que não houve correlação significativa entre a soropositividade com as características clínicas iniciais da doença, com o tipo de evento índice, bem como o intervalo e a gravidade destes mesmos eventos. Da mesma forma, não houve correlação significativa a recuperação dos pacientes *at recovery* das lesões visuais, motoras, sensitivas e esfinterianas (Tabela 2). Todavia, apesar do baixo nível de significância entre os eventos correlacionados, é possível observar algumas tendências nas diferenças entre os percentuais que vão se acentuando com o passar do tempo e atingir nível de significância na medida em que a doença evolui. Assim, quando olhamos para a 4, as diferenças não significativas apontadas se acentuam e passam a ser significativas para praticamente todos os parâmetros estudados, com os pacientes soropositivos atingindo em sua maioria o Modelo Devic.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstram inequivocamente a influência da positividade dos anticorpos anti-AQP4 na gravidade da NMO; o que vai ao encontro das observações de muitos autores (quadro 6), os quais fizeram as mesmas comparações e chegaram a conclusões semelhantes.

A evolução desfavorável dos pacientes soropositivos torna-se ainda mais clara quando olhamos para o número de pacientes que atingiram o Modelo Devic. Dos 25 pacientes soropositivos, 13 (52%) atingiram esta forma mais grave da enfermidade, contra apenas 1 (4,3%) dos soronegativos. Ficou da mesma forma patente a dificuldade na recuperação visual e esfinteriana dos pacientes soropositivos que chegaram ao Modelo Devic.

As análises de sobrevida trouxeram neste estudo informações preciosas quanto ao tempo que os pacientes soropositivos e soronegativos levaram para alcançar o ponto de maior gravidade da NMO (Modelo Devic). Considerando um

tempo de 5 anos, as análises das curvas de Kaplan Meier, já demonstra uma clara tendência do pior prognóstico entre os pacientes soropositivos, o que pôde ser confirmado através do teste do Log Rank ($p=0,059$). O mesmo teste aplicado para um tempo de 10 anos mostrou inequivocamente que a doença é mais grave nos pacientes soropositivos ($p=0,002$).

Com relação à mortalidade, apesar da maior parte dos pacientes que morreram terem sido soropositivos (7 de 9 pacientes), o teste Log-Rank não demonstrou diferença significativa ($p=0,214$) entre os grupos.

✚ Os anticorpos anti-AQP4 e imunopatologia da NMO

Os resultados apresentados neste trabalho apontam claramente para o envolvimento dos anticorpos anti-AQP4 na imunopatogênese da NMO, tirando-o da condição de mera condição de adjuvante para um elemento ativo e determinante de gravidade. Todavia, muitas questões sem resposta ainda sem resposta merecem ser consideradas no diz respeito a forma como esses anticorpos atuam.

Uma dessas questões é que esses anticorpos não se mostravam patogênicos ou são capazes de reproduzir experimentalmente a enfermidade, quando injetados em camundongos e ratos, mesmo se inoculados com complemento humano diretamente na veia dos animais. Tal impossibilidade de reprodução experimental da doença desponta como um contrassenso, posto que sejam as moléculas de AQP4 dos cortes de SNC desses animais, os antígenos para os quais os anticorpos humanos se acham voltados com alta afinidade nos ensaios de imunofluorescência indireta. Ademais, moléculas de IgG, que cruzam facilmente a barreira placentária, não se mostram capazes de causar alterações neurológicas nos bebês de mulheres com NMO, ao contrário de boa parte das doenças autoimunes conhecidas (PALMEIRA et al., 2012).

Entretanto, ensaios muito bem conduzidos, “in vitro”, demonstram que estes mesmos anticorpos anti-AQP4, purificados do soro dos pacientes, quando na presença de complemento, são capazes de induzir a lise de células alvo, quando na presença de complemento, ou induzir a interiorização dos complexos macromoleculares de membrana que contém AQP4 e EAAT2.

Mas como explicar tantos paradoxos envolvendo um anticorpo numa doença autoimune?

Problemas como este vêm sendo levantados por diferentes grupos de pesquisadores, que como o nosso grupo, já há algum tempo chamando a atenção para o papel das células T na imunopatogênese da NMO.

Naturalmente que o repertório de imunoglobulinas que compõem o sistema imune de um indivíduo é formado por muitos bilhões de tipos diferentes de moléculas de anticorpos multiespecíficas, capazes de se ligar com afinidade variável tanto aos antígenos próprios quanto não próprios. Dentro deste repertório, observa-se a ocorrência normal de autoanticorpos tanto de classe M (IgM), produzidos por células B1, quanto da classe G (IgG), produzido pelas demais células B (NAGELE et al., 2013). Sabe-se ainda que a sobrevivência ou não de um clone autoagressor de linfócitos B depende, além do imprescindível encontro casual com o seu respectivo autoantígeno, da ação moduladora exercida pelas citocinas produzidas por clones específicos ou não de células T helper, cuja atividade pode ser controlada ou não por citocinas de células T reguladoras, como a IL-10 e o TGF- β . Assim, a simples presença clones de células B autoagressoras e seus respectivos autoanticorpos, não constitui em nenhuma hipótese uma condição única, necessária e suficiente, para o desenvolvimento da doença autoimune. Ao contrário, várias combinações de eventos parecem concorrer para que a doença autoimune uma vez iniciada se perpetue.

Nosso grupo, assim como outros pesquisadores, tem demonstrado que o estado de autoagressão na NMO decorre da ativação do eixo IL-8/IL-17, seja no sangue periférico, seja no líquido (ISHIZU et al., 2005, LINHARES et al., 2013a). Este aparente estado de hiperatividade Th17, com aumento das citocinas relacionadas a este fenótipo, pode ser observado tanto no soro quanto no líquido de pacientes com NMO, sejam eles soropositivos ou não (LINHARES et al., 2013a). Além disso, ensaios “in vitro” demonstraram também a existência de respostas significativamente mais elevadas das células mononucleares periféricas dos pacientes com NMO às bactérias Gram negativas, como a *Escherichia coli* (BARROS et al., 2013), assim como, respostas anormalmente baixas dessas mesmas células aos efeitos inibitórios sobre a proliferação celular e a produção de citocinas provocados pelos glicocorticóides (dexametasona). Estes resultados justificam de certa forma a necessidade de doses terapêuticas muito elevadas de corticoides para controlar os surtos de NMO (LINHARES et al., 2013a).

A exacerbação do perfil fenotípico Th17 dos pacientes com NMO ajudam a explicar o padrão inflamatório característico da doença, isto é, de infiltrados ricos em linfócitos T (CD4+ e CD8+), células B e elementos próprios da resposta imune inata, como eosinófilos, polimorfonucleares e macrófagos. Além disso, é possível observar a deposição de subprodutos da ativação do complemento e de imunocomplexos, com a intensa hialinização dos vasos sanguíneos e a escassez de moléculas de aquaporina-4 no centro das lesões da maioria dos casos (Figura 5) (MISU et al., 2006, 2007).

Embora este padrão inflamatório no SNC dos pacientes com NMO seja bem característico, não fazendo distinção se os pacientes são soropositivos ou soronegativos, os imunocomplexos encontrados nas lesões não podem, em nenhuma hipótese, serem atribuídos exclusivamente à deposição de anticorpos anti-AQP4 ligados aos respectivos epitopos-alvo das moléculas AQP4, já que em pelo menos 30% dos casos de NMO são soronegativos. Diante disto, uma pergunta imediatamente se impõe: de onde então estariam vindo esses imunocomplexos?

A resposta a esta questão parece vir de dentro da própria fisiologia do sistema imune, já que a simples abertura da microcirculação pela ativação endotelial induzida por citocinas e quimiocinas inflamatórias é suficiente para que imunocomplexos de várias etiologias diferentes ou autoanticorpos entrem nos sítios inflamados e lá se depositem. Portanto, a presença de anticorpos anti-AQP4 no soro de pacientes com NMO não nos parece em hipótese alguma condição “sine qua non” para o desenvolvimento desta enfermidade. Todavia, por suas características “citotóxicas”, a sua presença pode e deve agravar significativamente a doença, como ficou muito bem estabelecido em nossos resultados.

Em nossos estudos, embora não tenha sido possível observar diferenças significativas quanto à idade, sexo ou raça, foi possível demonstrar que foram justamente os pacientes soropositivos aqueles que evoluíram para as formas mais graves da doença (forma Devic). Embora esses resultados contrastem com aqueles relatos apresentados por JIAO e cols. (2013) e CHANSON e cols. (2013), eles vão ao encontro das observações feitas por TAKAHASHI e cols. (2007), WANG e cols. (2011), YANG e cols. (2013) e JARIUS e cols. (2012) (Quadro 6). Este último autor, num estudo multicêntrico envolvendo 175 pacientes com síndrome do complexo da NMO, dos quais 119 tinham história de NO e MT, demonstrou que os enfermos soropositivos, os quais eram predominantemente do sexo feminino, apresentaram

recaídas clínicas mais graves ao longo do tempo. Além do mais, a perda da acuidade visual durante os surtos de neurite óptica aguda (NO) foi mais frequente e mais grave nos pacientes soropositivos, da mesma forma que os pacientes por nós estudados.

Tudo isto contribui para a confirmação da hipótese de que a soropositividade está relacionada à gravidade da NMO e que os anticorpos anti-AQP4 não são um mero epifenômeno na doença, mas contribuem decisivamente para o desfecho da mesma.

Tomados em conjunto, nossos resultados indicam claramente a participação dos anticorpos anti-AQP4 com um fator determinante de agravamento da NMO. Todavia, por quanto foi visto acima também, não é possível afirmar que os anticorpos anti-AQP4 sejam os elementos iniciadores da enfermidade, já que estes podem estar ausentes em cerca de 30% dos casos (FAZIO et al., 2009; KIM et al., 2012) ou ainda estar presente no soro de indivíduos com outras doenças autoimunes ou com alergias alimentares, através de mimetismos moleculares, com ou sem manifestações outras neurológicas (VOJDANI et al., 2015).

Outra hipótese envolvendo os autoanticorpos e ser considerada é que durante a instalação do processo inflamatório, havendo ou não anticorpos anti-AQP4 presentes no microambiente, a exposição a diferentes DAMPs pode levar a quebra de tolerância para vários autoantígenos diferentes (RUBARTELLI et al., 2007). Isto é o que teoricamente se espera; mas quando os cortes de tecido de sistema nervoso central são expostos ao soro de pacientes soropositivos, são as moléculas de AQP4 as únicas que aparentemente são marcadas. Havendo outros autoanticorpos, a inexistência de marcação em tecidos xenogênicos, só pode ser explicada se as moléculas alvo não forem suficientemente conservadas ao longo da escala filogenética, o que não é o caso das moléculas das aquaporinas. Isto se repetiria também nos testes de ELISA e naqueles com células transfetadas (HEK 293) com genes de AQP4, já que em ambos os casos trabalhamos com antígenos específicos e não com pool total de antígenos do SNC. Embora uma resposta precisa não possa ser dada neste momento, alguns autoanticorpos não relacionados especificamente a NMO vêm sendo relatados em outras doenças do complexo da NMO, como, por exemplo, os anticorpos anti-MOG, descritos sobretudo em pacientes soronegativos.

Moléculas de anticorpos normalmente não estão presentes nos tecidos. Elas são produzidas por linfócitos B principalmente dentro dos linfonodos, os quais

concentram os antígenos dispersos pelo corpo. Elas estão presentes no soro, tomando parte de uma extensa rede de conectividade através das interações com os idiotipos de outras moléculas de anticorpos e dos receptores de antígenos das células T. No soro, as moléculas de anticorpos atuam como neutralizantes de antígenos solúveis, elas favorecem a fagocitose de microrganismos e a ativação das proteínas do complemento. Elas têm acesso ao interior dos tecidos, inicialmente lesados ou não, no bojo de um conjunto de eventos que levam à ativação endotelial e a transmigração de células e moléculas para o interior das áreas inflamadas.

A produção de autoanticorpos pelas células B fora dos linfonodos, ou seja, no interior dos tecidos lesados é algo questionável e somente em poucos casos, como na EM, por exemplo, tem sido possível observar. Todavia, mesmo na EM esboços rudimentares de centros germinativos de linfonodos foram descritos e relacionados à produção das bandas oligoclonais (TOURTELLOTTE et al., 1984).

Existem muitas controvérsias sobre o real papel das células B e seus anticorpos na manutenção de respostas autoimunes prolongadas. Anticorpos são moléculas multiespecíficas, capazes de se ligar com afinidade variável a diferentes antígenos sejam eles próprios ou não. Dentro da extensa rede de conectividade de interações idiotípicas de que participa, o número de células de um clone de linfócitos B e seus respectivos anticorpos pode variar em função da presença de agentes perturbadores externos ou simplesmente como resultado de interações estruturais internas do próprio sistema imune, onde clones de células autoagressoras podem naturalmente aparecer e desaparecer como fruto da deriva natural de um sistema dinâmico e caótico. Assim, a questão fundamental não é se os clones de B células autoagressoras existem ou não, até porque as células B não passam por critérios de seleção clonais tão rígidos quanto às células T. O importante é saber se as células B autoagressoras, que normalmente tomam parte da rede de idiotípica, são capazes sustentar respostas autoimunes prolongadas, juntamente com as células T (JERNE 1985,1989; ERLANGER et al., 1989).

Respostas inflamatórias com morte excessiva de células e dificuldade de eliminação de tecidos necrosados, assim como de debris apoptóticos, podem fazer proliferar e escapar ao autocontrole células B potencialmente autoagressoras. Esse auto reatividade pode estar voltada para diferentes tipos de DAMPs, inclusive par moléculas de TLRs. Assim, células B engajadas, pela ativação de seus receptores de antígenos ou de TLRs podem levar à quebra de tolerância e ao desenvolvimento

da doença autoimune, caso haja um adequado assessoramento das células T (MARTINS et al., 2015; SUURMOND; DIAMOND, 2015).

O resultado da combinação de anticorpos com antígenos (próprios ou não) é a formação de macromoléculas de imunocomplexos, cujo depósito constitui uma das principais características do quadro histopatológico da NMO. Essas macromoléculas formam-se normalmente no organismo são eliminadas principalmente por macrófagos, através da endocitose via receptores de Fc. A deposição dos imunocomplexos nos tecidos depende, entre outras coisas, das características físico-químicas dos mesmos e das propriedades locais da microcirculação. Os rins são órgãos especialmente susceptíveis a esta deposição e a subsequente formação de vasculites, dadas peculiaridade de seus tufo glomerulares (PETI-PETERDI; KIDOKORO; RQUIER-BRISON, 2015). Assim, nas glomerulonefrites pós-estreptocócicas, no lúpus eritematoso sistêmico e na doença do soro o paciente poderá rapidamente evoluir para a insuficiência renal na dependência da extensão das lesões. Entretanto, os imunocomplexos podem ser formados nos próprios órgãos-alvo de deposição, como na glomerulonefrite de Goodpasture (HELLMARK; SEGELMARK, 2014). Em ambos os casos, a ativação endotelial com a liberação de citocinas quimioatraentes (IL-8, IL-17), induzirá a migração de células fagocíticas como macrófagos, polimorfonucleares e até mesmo eosinófilos, assim como a fixação e a deposição de proteínas do complemento. Estes processos inflamatórios não parecem diferir muito daqueles observados na NMO, contando aparentemente com a mesma ação imunomoduladora primária dos linócitos Th17 (ZHANG et al., 2013).

Curiosamente, doenças produzidas por imunocomplexos, com imunopatogênese diferente da tradicional doença soro já haviam sido descritas por John Auer, cinco anos antes da descoberta das moléculas de anticorpos por Landsteiner em 1925. Auer em seu clássico trabalho de 1920 (AUER, 1920) demonstrou que a simples pincelagem de xilol nas orelhas de coelhos previamente sensibilizados com albumina bovina e a subsequente inoculação intravenosa desta mesma albumina gerava "imunocomplexos" em quantidade suficiente para necrosar as orelhas dos animais e até mesmo matá-los de glomerulonefrite aguda. Esta pequena curiosidade citada aqui nesta discussão, pode representar um dos principais pilares de sustentação da fisiopatologia de inflamatórias, sejam elas de natureza autoimune ou não. E por que não dizer da própria NMO?

Doenças como a NMO têm certamente mecanismos patogênicos muito complexos e provavelmente envolve diversos processos imunopatogênicos diferentes. Um possível fenômeno que não está relacionado diretamente à deposição de imunocomplexos, mas que pode perfeitamente contribuir para a deposição dos mesmos e facilitar a entrada de anticorpos anti-AQP4 específicos nas lesões é a chamado fenômeno de Schwartzman, descrita originalmente pelo médico americano Gregory Schwartzman (SHWARTZMAN, 1928; KARSNER; MORITZ, 1934). Este fenômeno constitui uma reação necrótica da pele sensibilizada previamente com lipopolissacarídeos (LPS) seguida à injeção sistêmica de LPS.

Recentemente foi demonstrado por pesquisadores do nosso grupo a existência de níveis significativamente elevados de lipopolissacarídeos (LPS) no soro de pacientes com NMO (BARROS et al., 2013). Os motivos para este aumento de LPS ainda não são claros, mas é possível que as manipulações das vias urinárias nos pacientes com infecções crônicas ou recorrentes sejam as fontes desses LPS. Assim, inflamações “latentes” do SNC de pacientes com NMO, provocadas por diferentes fatores, inclusive virais, poderiam ser reativadas constantemente pela presença de LPS (PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos), o que levaria à liberação sistêmica de citocinas inflamatórias como a IL-6, IL-1 e TNF-alfa (LUHESHI, 1998).

Nos pacientes com NMO uma conjunção de fatores pode concorrer para o agravamento dos surtos, sobretudo naqueles soropositivos. A entrada dos autoanticorpos anti-AQP4 pode ser facilitada pela abertura da microcirculação local provocada por citocinas quimioatraentes (quimiocinas) (HEADLAND; NORLING, 2015; SANKOWSKI; MADER; VALDÉS-FERRER, 2015) produzidas por células do próprio tecido do sistema nervoso, bem como pelas células endoteliais ativadas e pelas células da imunidade inata e adquirida que foram atraídas e imobilizadas nos sítios de inflamação. Anticorpos dirigidos para componentes de complexos juncionais das células endoteliais descritos em 71,4% dos pacientes com NMO (SHIMIZU et al., 2012.) também podem contribuir para a quebra da barreira hematoencefálica e facilitar a entrada de autoanticorpos e de células potencialmente autoagressoras para o interior do SNC.

Outra questão que não pode deixar de ser considerada, mas que frequentemente é negligenciada na maior parte das discussões sobre o assunto, é que de uma maneira geral as reações de autoagressão ocorrem pela ação de

autoanticorpos ou por células (linfócitos T citotóxicos CD8+, células NK e linfócitos Th17) ou por ambos.

Revisando a literatura sobre NMO, não identificamos qualquer publicação fazendo menção à existência de aspectos histopatológicos diferentes entre as lesões de pacientes soropositivos e soronegativos. Além do mais, os trabalhos realizados mostrando as diferenças radiológicas entre os dois grupos, enfatizam muito mais as questões relacionadas ao número, à extensão e a consequente gravidade das lesões do que as questões relacionadas à co-localização destas mesmas lesões com as áreas de maior concentração de aquaporina-4 propriamente ditas. Estudos comparativos realizados através de imagens (RM) demonstraram que os pacientes soropositivos tinham lesões significativamente ($p < 0,05$) mais evidentes no trato corticoespinal, nos terceiro e quarto ventrículos. Além disso, as lesões medulares extensas nestes pacientes acometiam predominantemente as regiões subependimárias e a substância cinzenta central da medula. Enquanto a maior parte dos enfermos soronegativos apresentavam lesões na medula torácica, os doentes soropositivos demonstravam comprometimentos cervicotorácicos compatíveis com uma maior gravidade da enfermidade. Apesar das fortes evidências indicando diferenças quanto à co-localização das lesões e às áreas de maior densidade de moléculas de AQP4, não há, até o momento, relatos de diferenças quanto aos aspectos histopatológicos das lesões de pacientes soropositivos e soronegativos. Assim, as diferenças clínicas apontadas até aqui têm sido sustentadas mais por questões relacionadas à localização das lesões do que pelas diferenças na imunopatogênese das mesmas, o que em última análise seria a verdadeira responsável.

Outro fato que não pode deixar de ser considerado é que não existe, até onde podemos verificar trabalhos na literatura demonstrando que pacientes soronegativos se tornem soropositivos e vice-versa. Embora variações na concentração de um dado anticorpo possam ocorrer normalmente dentro do sistema imune em função das flutuações naturais do repertório de idiotipos das células B, não existe relato de que essas flutuações possam fazer surgir e desaparecer num mesmo paciente os autoanticorpos anti-AQP4. Diante disso, e diante das diferenças marcantes observadas por nós no que diz respeito à evolução clínica dos pacientes soropositivos e soronegativos, é possível admitir, a menos que se comprove a soroconversão ou soronegativação num mesmo indivíduo, a existência dois

diferentes tipos de paciente com NMO, isto é, os anti-AQP4 positivos e os anti-AQP4 negativos. Tal diferença implicaria em prognósticos e tratamentos diferentes. Admitir esta diferença parece ser a tendência de boa parte dos autores, cujas publicações confrontam as características clínicas e demográficas dos pacientes com NMO (QUADRO 6).

Outro dado extraído de nossas análises que chama atenção é a questão da idade. A positividade dos anticorpos foi significativamente maior nos pacientes mais jovens, os quais por sua vez levaram menos tempo para atingir o Modelo Devic.

Embora não sermos capazes de dar uma explicação satisfatória para isto, é possível especular que os indivíduos mais jovens contam com um repertório de células potencialmente autoagressoras maior do que os indivíduos mais velhos. As análises dos receptores de antígenos das células T (TCR) potencialmente autoagressores de pacientes com NMO têm se mostrado significativamente altos, se comparado aos pacientes com EM. Além disso, tem sido relatada a existência de uma correlação direta entre o número destes clones com o maior grau na escala do EDSSS (WARABI et al., 2006).

Após quanto foi visto acima, é possível afirmar que há considerável número de evidências de que a positividade dos anticorpos anti-AQP4 contribui decisivamente para a maior gravidade desses pacientes. Em nossa série foi possível demonstrar a existência de uma correlação positiva entre os pacientes considerados mais graves, isto é, que apresentavam a “forma Devic” da NMO com a soropositividade, o que está de acordo com dados disponíveis na literatura (Quadro 6).

9 CONCLUSÃO

- Através da técnica da imunofluorescência, nós demonstramos que o número de pacientes com NMO soropositivos foi de 52,08%, o que se aproxima bastante das estatísticas mundiais.
- Em nosso trabalho não foi possível demonstrar qualquer diferença significativa entre os pacientes soropositivos e soronegativos no que diz respeito ao sexo, a raça, ao tempo de doença e a presença de comorbidades auto imunes.
- Os pacientes soropositivos foram os que apresentaram uma menor média de idade no início da doença.
- A adoção do Modelo Devic mostrou-se muito útil como forma de avaliação da gravidade da NMO. Tendo sido possível demonstrar que dos 14 pacientes que atingiram o Modelo Devic, 13 eram soropositivos.
- Pelas análises das curvas de sobrevida, foi possível observar uma clara tendência dos pacientes soropositivos de alcançarem o Modelo Devic da NMO em 5 anos de evolução da enfermidade.
- A tendência dos pacientes soropositivos atingirem a forma mais graves da doença atingiu nível de significância estatística quando o tempo de 5 anos de evolução da enfermidade foi estendido para 10 anos.
- Finalmente foi possível concluir que a soropositividade implica em pior prognóstico para os pacientes, ficando claro que os anticorpos anti-AQP4 não constituem de forma alguma um mero epifenômeno na neuromielite óptica.

10 ÉTICA

Os pacientes portadores de NMO, convidados a realizar o estudo genético e laboratorial em Málaga, assinaram termo de consentimento informado para coleta e envio de amostras de sangue para o Hospital Regional Universitario Carlos Haya (Málaga - Espanha). Os projetos de estudo da associação HLA – EM/NMO estão cadastrados na Pró-reitoria de pesquisa da UNIRIO e foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital Universitario Gaffrée e Guinle.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; GHILARDI, N.; XIE, M.H.; DE SAUVAGE, F.J.; GURNEY A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. **J Biol Chem.**, v.278, p.1910-1914, 2003.

AKMAN-DEMIR, G.; TÜZÜN, E.; WATERS, P.; IÇÖZ, S.; KÜRTÜNCÜ, M.; JARIUS, S.; YAPICI, Z.; MUTLU, M.; YEŞİLOT, N.; VINCENT, A.; ERAKSOY, M. Prognostic implications of aquaporin-4 antibody status in neuromyelitis optica patients. **J Neurol.**, v.258, n.3, p.464-470, 2011.

ANDERSON, C.M.; SWANSON, R.A. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. **Glia.** v.32, n.1, p.1-14, 2000.

ANTHONY, T.; BROOKS, H.; BOASSA, D.; LEONOV, S.; YANOCHKO, G.; REGAN, J.; YOOL, A. Cloned human aquaporin-1 is a cyclic GMP-gated ion channel. **Mol Pharmacol.**, v.57, p.576-88, 2000.

ARGYRIOU, A. A.; MAKRIS, N. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. **Acta Neurol Scand.**, v.118, 209-217, 2008.

AUER, J. Local autoinoculation of the sensitized organism with foreign protein as a cause of abnormal reactions. **J Exper Med.**, v.32, p. 427, 1920.

BARNES, P.J. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clin Sci.**, v.94, n.6, p.557-572, 1998.

BECHMANN, I.; PRILLER, J.; KOVAC, A.; BONTERT, M.; WEHNER, T.; KLETT, F. F.; BOHSUNG, J.; STUSCHKE, M.; DIRNAGL, U.; NITSCH, R. Immune surveillance of mouse brain in perivascular spaces by blood-borne macrophages. **Eur J Neurosci.**, v.14, p.1651-1658, 2001.

BARROS, P.O.; LINHARES, U.C.; TEIXEIRA, B.; KASAHARA, T.M.; FERREIRA, T.B.; ALVARENGA, R.; HYGINO, J.; SILVA-FILHO, R.G.; BITTENCOURT, V.C.; ANDRADE, R.M.; ANDRADE, A.F.; BENTO, C.A. High in vitro immune reactivity to Escherichia coli in neuromyelitis optica patients is correlated with both neurological disabilities and elevated plasma lipopolysaccharide levels. **Hum Immunol.** v. 74, n.9, p.1080-1087, 2013.

BONASIO, R.; VON ADRIAN, U.H. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. **Curr Op Immunol**, v.18, p.503-511, 2006.

BRAD, M; MISU, T.; TAKAHASHI, T.; WATANABE, M.; MADER, S.; REINDL, M.; ADZEMOVIC; M.; BAUER, J., BERGER T., FUJIHARA, K.; ITOYAMA, Y.; LASSMANN, H. Neuromyelitis Optica: Pathogenicity of Patient Immunoglobulin In Vivo. **Ann Neurol.**, v.66, p.630-643, 2009.

BUTT, A.M.; KALSI, A. Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. **J Cell Mol Med.**, v.10, n.1, p.33-44, 2006.

CABRERA-GOMEZ, J.A.; KURTZKE, J. F.; GONZALEZ-QUEVEDO, A.; LARA-RODRIGUEZ, R. An epidemiological study of neuromyelitis optica in cuba. **J Neurol.**, v.256, p.35-44, 2009.

CAO, W.; LIU, Y.J. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. **Curr Op Immunol.**, v.19, n.1, p.24-30, 2007.

CARBONE, F. R.; HEATH, W. R. The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. **Curr Op Immunol.**, v.15, n.4, p. 416-420, 2003.

CHANSON, J.B.; ALAME, M.; COLLONGUES, N.; BLANC, F.; FLEURY, M.; RUDOLF, G.; DE SEZE, J.; VINCENT, T. Evaluation of clinical interest of anti-aquaporin-4 autoantibody followup in neuromyelitis optica. **Clin Dev Immunol.**, v.2013, p.146219, 2013.

CHEN, J.Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases. **Clin Rev Allergy Immunol.**, 2015.

COISNE, C.; MAO, W.; ENGELHARDT, B. Cutting edge: natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T-cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis. **J Immunol.**, v.182, n.10, p.5909-5913, 2009.

COOPER, G.; BORON, W. Effect of PCMBs on CO₂ permeability of *Xenopus* oocytes expressing aquaporin 1 or its C189S mutant. **Am J Physiol.**, v.275, p.C1481-1486, 1998.

COOPER, G.; ZHOU, Y.; BOUYER, P.; GRICHTCHENKO, I.; BORON, W. Transport of volatile solutes through AQP1. **J Physiol.**, v.542, p.17-29, 2002.

COQUERELLE, C.; MOSER, M. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. **Immunol Rev.**, v. 234, n.1, p.317-334, 2010.

CRANE.; J.M.; LAM, C.; ROSSI, A.; GUPTA, T.; BENNETT, J.L.; VERKMAN, A.S. Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. **J Biol Chem.**, v.286, n.18, p.16516-16524, 2011.

CSERR, H. F.; KNOPF, P. M. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain. **Immunol today.**, v.13, p. 507-512, 1992.

DEVIC, E. Myélite aiguë dorso-lombaire avec névrite optique-Autopsie. In: **Congrès français de médecine** (Première Session; Lyon, 1894; procès-verbaux, mémoires et discussions; publiés par M. le Dr L. Bard). Paris: Lyon: Asselin et Houzeau, Louis Savy, 1895, p.434-439.

DOMENE, C.; BOND, P.; DEOL, S.S.; SANSOM, M. Lipid/protein interactions and the membrane/water interfacial region. **J Am Chem Soc.**, v.125, p.14966-14967, 2003.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R. M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: Anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunol.**, v.26, p.485-495, 2005.

ENGELHARDT, B. Molecular mechanisms involved in t-cell migration across the blood-brain barrier. **J Neural Transm.**, v.113, n.4, p. 477-485, 2006.

ERLANGER, B.F. Auto-anti-idiotypy, autoimmunity and some thoughts on the structure of internal images. **Int Rev Immunol.**, v.5, n.2, p.131-137, 1989.

FAZILLEAU, N.; MCHEYZER-WILLIAMS, L.J.; MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. Local development of effect or and memory T-helper cells. **Curr Op Immunol.**, v.19, n.3, p. 259-267, 2007.

FAZIO R, MALOSIO ML, LAMPASONA V, DE FEO D, PRIVITERA D, MARNETTO F, CENTONZE D, GHEZZI A, COMI G, FURLAN R, MARTINO G. Anti-aquaporin 4 antibodies detection by different techniques in neuromyelitis optica patients. **Mult Scler.**, v.15,n.10, p.1153-1163, 2009.

FILIPPINI, G.; BRUSAFERRI, F.; SIBLEY, W.A.; CITTERIO, A.; CIUCCI, G.; MIDGARD, R.; CANDELISE, L. Corticosteroids or acth for acute exacerbations in multiple sclerosis. **Datab Syst Rev.**, v.4, 2000.

FUJIHARA, K.; LEITE, M.I. Seronegative NMO: A sensitive AQP4 antibody test clarifies clinical features and next challenges. **Neurol.**, v.80, n.24, p.2176-2217, 2013.

FURMAN, C. S.; GORELICK-FELDMAN, D.A.; DAVIDSON, K.G.; YASUMURA.T.; NEELY, J.D.; AGRE, P.; RASH, J. E. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. **Proc Nat Acad Sci USA.**, v.100, p. 13609-13614, 2003.

GAVINS, F.N.; HUGHES, E.L.; BUSS, N.A.; HOLLOWAY, P.M.; GETTING, S.J.; BUCKINGHAM, J.C. Leukocyte recruitment in the brain in sepsis: involvement of the annexin 1-fpr2/alx anti-inflammatory system. **FASEB J.**, v. 26, n.12, p.4977-4989, 2012.

GOLDMANN, J.; KWIDZINSKI, E.; BRANDT, C.; MAHLO, J.; RICHTER, D.; BECHMANN, I. T-cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa. **J Leukoc Biol.**, v. 80, n.4, p.797-801, 2006.

GUTCHER, I.; BECHER, B. APC-derived cytokines and T-cell polarization in autoimmune inflammation. **J Clin Invest.**, v.117, n.5, p.1119- 11127, 2007.

HATTON, J.D.; ELLISMAN, M.H. The distribution of orthogonal arrays in the freeze-fractured rat median eminence. **J Neurocytol.**, v.11, p.335-349, 1982.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L.V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol.**, 2015.

HELLMARK, T.; SEGELMARK, M. Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM). **J Autoimmun.**, v.48-49, p.108-112, 2014.

HEYMANN, B. J.; ENGEL, A . Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. **News Physiol Sci.**, v.14, p. 187-193, 1999.

HICKEY, W.F. Leukocyte traffic in the central nervous system: The participants and their roles. **Sem Immunol.**, v.11, n. 2, p. 125-137, 1999

HICKEY, W.F. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. **Glia.**, v.36, p.118-124, 2001.

HINSON, S.R.; PITTOCK, S.J.; LUCCHINETTI, C.F.; ROEMER, S.F.; FRYER, J.P.; KRYZER, T.J.; LENNON, V.A. Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. **Neurol.**, v.69, n.24, p. 2221-31, 2007.

HINSON, S.R.; ROEMER, S.F.; LUCCHINETTI, C.F.; FRYER, J.P.; KRYZER, T.J.; CHAMBERLAIN, J.L.; HOWE, C.L.; PITTOCK, S.J.; LENNON, V.A. Aquaporin-4 – binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by downregulating EAAT2. **JEM.**, v.205, n.11, p.2473-2481 , 2008.

HINSON, S.R.; MCKEON, A.; FRYER, J.P.; APIWATTANAKUL, M.; LENNON, V.A.; PITTOCK, S.J. Prediction of neuromyelitis optica attack severity by quantitation of complement-mediated injury to aquaporin-4-expressing cells, **Arch Neurol.**, v.66, p.1164-1167, 2009.

HIROAKI, Y.; TANI, K.; KAMEGAWA, A.; GYOBU, N.; NISHIKAWA, K.; SUZUKI, H.; WALZ, T.; SASAKI, S.; MITSUOKA, K.; KIMURA, K.; MIZOGUCHI, A.; FUJIYOSHI, Y. Implications of the aquaporin-4 structure on array formation and cell adhesion. **J Mol Biol.**, v.355, p.628-639, 2006.

HOORBAKHT, H.; BAGHERKASHI, F. Optic neuritis, its differential diagnosis and management. **Open Ophthalmol J.**, v.6, p.65-72, 2012.

HUGUES, S.; BOISSONNAS, A.; AMIGORENA, S.; FETLER, L. The dynamics of dendritic cell - T-cell interactions in priming and tolerance. **Curr Op Immunol.**, v.18, p.491-495, 2006.

ISHIZU, T.; OSOEGAWA, M.; MEI, F.J.; KIKUCHI, H.; TANAKA, M.; TAKAKURA, Y.; MINOHARA, M.; MURAI, H.; MIHARA, F.; TANIWAKI, T. Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis. **Brain.** v.128, p.988-1002, 2005.

JACOBSON, C.; COTE, P.D.; ROSSI, S.G.; ROTUNDO, R.L.; CARBONETTO, S. The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetyl-choline receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. **J Cell Biol.**, v.152, p.435-450, 2001.

JARIUS, S.; ABOUL-ENEIN, F.; WATERS, P.; KUENZ, B.; HAUSER, A.; BERGER, T.; LANG, W.; REINDL, M.; VINCENT, A.; KRISTOFERITSCH, W. Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. **Brain** v. 131, p.3072-3080, 2008.

JARIUS, S.; WILDEMANN, B. AQP4 antibodies inneuromyelitis optica: Diagnostic and pathogenetic relevance. **Nat Rev Neurol.**, v.6, p.383-392, 2010a.

JARIUS, S.; FRANCIOTTA, D.; BERGAMASCHI, R.; WILDEMANN, B, WANDINGER KP. Immunoglobulin M antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders. **Clin Chem Lab Med.**, v. 48, p. 659-663, 2010b.

JARIUS; S.; PAUL, F.; FRANCIOTTA, D.; RUPRECHT. K.; RINGELSTEIN, M.; BERGAMASCHI, R.; ROMMER, P., KLEITER, I.; STICH, O.; REUSS, R.; RAUER, S.; ZETTL, U.K.; WANDINGER, K.P.; MELMS, A.; AKTAS, O.; KRISTOFERITSCH, W.; WILDEMANN, B. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: Results from 211 lumbar punctures. **J Neurol Sci.**, v.306, p. 82-90, 2011.

JARIUS S.I.; RUPRECHT K.; WILDEMANN B.; KUEMPFFEL T.; RINGELSTEIN M.; GEIS C.; KLEITER I.; KLEINSCHNITZ C.; BERTHELE A.; BRETTSCHEIDER J.; HELLWIG K.; HEMMER B.; LINKER R.A.; LAUDA F.; MAYER C.A.; TUMANI H.; MELMS A.; TREBST C.; STANGEL M.; MARZINIAK M.; HOFFMANN F.; SCHIPPLING S.; FAISS J.H.; NEUHAUS O.; ETTRICH B.; ZENTNER C.; GUTHKE K.; HOFSTADT-VAN OY U.; REUSS R.; PELLKOFER H.; ZIEMANN U.; KERN P.; WANDINGER K.P.; BERGH F.T.; BOETTCHER T.; LANGEL S.; LIEBETRAU M.; ROMMER P.S.; NIEHAUS S.; MÜNCH C.; WINKELMANN A.; ZETTL U.K.; METZ I.; VEAUTHIER C.; SIEB J.P.; WILKE C.; HARTUNG H.P.; AKTAS O.; PAUL F.J. Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. **Neuroinflam.**, v.19, n. 9, p.14, 2012.

JARIUS, S. Aquaporin-4 antibody testing: direct comparison of M1-AQP4-DNA-transfected cells with leaky scanning versus M23-AQP4-DNA-transfected cells as antigenic substrate. **J Neuroinflam.**, v.11, n.1, p. 129, 2014.

JERNE, N.K. The generative grammar of the immune system. **Science.** v.229, n. 4718, p.1057- 9, 1985.

JERNE, N.K.; ROLAND, J.; CAZENAVE, P.A. Recurrent idiotopes and internal images. **EMBO J.** 1982;1(2):243-7 Erlanger BF. Auto-anti-idiotypy, autoimmunity and some thoughts on the structure of internal images. **Int Rev Immunol.**, v.5, n.2, p.131-137, 1989.

JIAO, Y.; FRYER, J.P.; LENNON, V.A.; JENKINS, S.M.; QUEK, A.M.; SMITH, C.Y.; MCKEON, A.; COSTANZI, C.; IORIO, R.; WEINSHENKER, B.G.; WINGERCHUK, D.M.; SHUSTER, E.A.; LUCCHINETTI, C.F.; PITTOCK, S.J. Updated estimate of AQP4-IgG serostatus and disability outcome in neuromyelitis optica. **Neurol.**, v.81, n.14, p.1197-1204, 2013.

JIN, B.J.; ROSSI, A.; VERKMAN, A.S. Model of aquaporin-4 supramolecular assembly in orthogonal arrays based on heterotetrameric association of M1-M23 isoforms. **Biophys J.**, v.100, n.12, p.2936-2945, 2011.

JUNG, J.S.; BHAT, R.V.; PRESTON, G.M.; GUGGINO, W.B.; BARABAN, J.M.; AGRE, P. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. **Proc Nat Acad Sci USA.**, v.91, p. 13052-13056, 1994.

KALLURI, S.R.; ROTHHAMMER V, STASZEWSKI O, SRIVASTAVA R, PETERMANN F, PRINZ M, HEMMER B, KORN T. Functional characterization of aquaporin-4 specific T cells: towards a model for neuromyelitis optica. **PLoS One.**, v.6, n.1, p. e16083, 2011.

KANG, J.W.; KIM, S.J.; CHO, H.I.; LEE, S.M. DAMPs activating innate immune responses in sepsis. **Ageing Res Rev.**, v.pii:S1568-1637, n.15, p.00031-00038, 2015.

KARIM, S.; MAJITHIA, V. Devic's syndrome as initial presentation of systemic lupus erythematosus. **Am J Med Sci.**, v.338, n.3, p.245-247, 2009.

KARSNER, H.T.; MORITZ, A.R. Pathologic histology of the shwartzman phenomenon with interpretative comments. **J Exp Med.**, v.60, n.1, p.37-48, 1934.

KASTELEIN, R.A.; HUNTER, C.A.; CUA, D.J Discovery and biology of IL-23 and IL-27: Related but functionally not inducers of matrix metalloproteinases and proinflammatory cytokines upon synovial fibroblast interaction, including autocrine interleukin-17a production. **Arth Rheum.**, v. 63, n.1, p. 73- 83, 2007.

KEEGAN, M.; PINEDA, A.A.; MCCLELLAND, R.L.; DARBY, C.H.; RODRIGUEZ, M.; WEINSHENKER, B.G. Plasma exchange for severe attacks of cns demyelination: predictors of response. **Neurol.**, v.58, p.143-146, 2002.

KETELSLEGERS, I.A.; MODDERMAN, P.W.; VENNEGOOR, A.; KILLESTEIN, J.; HAMANN, D.; HINTZEN, R.Q. Antibodies against aquaporin-4 in neuromyelitisoptica: Distinction between recurrent and monophasic patients. **Mult Scler.**, v.17, p.1527-1530, 2011.

KIM, W.; LEE, J.E.; LI, X.F.; KIM, S.H.; HAN, B.G.; LEE, B.I.; KIM, J.K.; CHOI, K.; KIM, H.J. Quantitative measurement of anti-aquaporin-4 antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay using purified recombinant human aquaporin-4. **Mult Scler.**, 2011.

KING, L.S.; KOZONO, D.; AGRE, P. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.5, n.9, p.687-698, 2004.

KINOSHITA M, NAKATSUJI Y, KIMURA T, MORIYA M, TAKATA K, OKUNO T, KUMANOGOH A, KAJIYAMA K, YOSHIKAWA H, SAKODA S. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. **Bio Bioph Res Com.**, v. 386, p.623-627, 2009.

KIRA, J.; YAMASAKI, K.; HORIUCHI, I.; OHYAGI, Y.; TANIWAKI, T.; KAWANO, Y. Changes in the clinical phenotypes of Multiple Sclerosis during the past 50 years in Japan. **J Neurol Sci.**, v.166, p.53-57, 1999.

KIRA, J. Autoimmunity in neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Astrocytopathy as a common denominator in demyelinating disorders. **J Neurol Sci.**, v.311, p.69-77, 2011a.

KIRA, J. Neuromyelitis optica and opticospinal multiple sclerosis: Mechanisms and pathogenesis. **Pathophysiol.**, v.18, n.1, p. 69-79, 2011b.

KISTER, I.; GE, Y.; HERBERT, J.; SINNECKER, T.; WUERFEL, J.; PAUL, F. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution. **Neurol.**, v.81, n.22, p.1966, 2013.

KLEINewIETFELD, M.; HAFLEr DA. Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. **Immunol Rev.**, v.259, n.1, p.231-244, 2014.

KORN, T.; BETTELLI, E.; GAO, W.; AWASTHI, A.; JAGER, A.; STROM, T.B.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T (H) 17 cells. **Nat.**, v.448, p.484-487, 2007.

KOZONO, D.; YASUI, M.; KING, L. S.; AGRE, P. Aquaporin water channels: atomic structure and molecular dynamics meet clinical medicine. **J Clin Invest** ., v.109, p.1395-1399, 2002.

KRISHNAMOORTHY, G.; LASSMANN, H.; WEKERLE, H.; HOLZ, A. Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. **J Clin Invest** ., v.116, p.2385, 2006.

KRUSE, E.; NORBERT, U.; RALF, K. The aquaporins. **Gen Biol.**, v.7, p.206, 2006.
KURTZKE, J.F. A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis. **Neurol.**, v.5, p.580-583, 1955.

KURTZKE, J.F. Neurologic Impairment in Multiple Sclerosis and the Disability Status Scale. **Acta Neurol Scand.**, v.42, p.493-512, 1970.

KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurol.**, v.33, p.1444-1452, 1983.

KUSHWAH R, HU J. Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. **Cell Biosci.**, v.1,n.1,p.20, 2011.

LAI, C.L.; TIAN, G.; TAKAHASHI, T.; LIU, W.; YANG, L.; ZHANG, X. Neuromyelitis optica antibodies in patients with severe optic neuritis in China. **J Neuroophthalmol.**, v.31, n.1, p.16-9, 2011.

LANDIS, D.M.; REESE, T.S. Arrays of particles in freeze-fractured astrocytic membranes. **J. Cell Biol.**, v.60, p.316-320, 1074.

LASSMANN, H.; ROSSLER, K.; ZIMPRICH, F.; VASS, K. Expression of adhesion molecules and histocompatibility antigens at the blood-brain barrier. **Brain Pathol.**, v.1, n.2, p.115-123, 1991.

LEFKOWITZ, D.; ANGELO, J. N. Neuromyelitis optica with unusual vascular changes. **Arch Neurol.**, v.41, p.1103-1105, 1984.

LENNON VA, WINGERCHUK DM, KRYZER TJ, PITTOCK SJ, LUCCHINETTI CF, FUJIHARA K, NAKASHIMA I, WEINSHENKER BG. Serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. **Lancet.**, v.364, p. 2106-2112, 2004.

LENNON, V.A.; KRYZER, T.J.; PITTOCK, S.J.; VERKMAN, A.S.; HINSON S.R. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4water channel. **J Exp Med.**, v. 202, p.473-477, 2005.

LIANG, S.C.; TAN, X.Y.; LUXENBERG, D.P.; KARIM, R.; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K.; COLLINS, M. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med.**, v.203, p.2271-2279, 2006.

LINHARES, U.C.; SCHIAVONI, P.B.; BARROS, P.O.; KASAHARA, T.M.; TEIXEIRA, B.; FERREIRA, TB.; ALVARENGA, R.; HYGINO, J.; VIEIRA, M.M.; BITTENCOURT, V.C.; ANDRADE, R.M.; ANDRADE, A.F.; BENTO, C.A. The ex vivo production of IL-6 and IL-21 by CD4+ T-cells is directly associated with neurological disability in neuromyelitis optica patients. **J Clin Immunol.**, v.33, n. 1, p.179-189, 2013a.

LINHARES, U.C. **Avaliação do perfil fenotípico de células T de pacientes com neuromielite óptica durante o período de remissão.** Tese (Doutorado em Neurologia) – Centro De Ciências Biológicas e da Saúde. Escola de Medicina e Cirurgia – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Neurologia - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- UNIRIO- Rio de Janeiro: RJ, 2013b.

LU, M.; LEE, M.D.; SMITH, B.L.; JUNG, J.S.; AGRE, P.; VERDIJK, M. A.; MERKX, G.; RIJSS, J. P.; DEEN, P.M. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.93, p.10908-10912, 1996.

LUCCHINETTI, R. N.; MANDLER, D.; MCGAVERN, W.; BRUCK, G.; GLEICH, R.M.; RANSOHOFF, C.; TREBST, B.; WEINSHENKER, D.; WINGERCHUK, J. E.; PARISI, H.; LASSMANN. A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. **Brain**, v.125 p.1450-1461, 2002.

LUHESHI GN. Cytokines and fever. Mechanisms and sites of action. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 856, p.83-89, 1998.

MADER, S.; LUTTEROTTI, A.; DI PAULI, F.; KUENZ, B.; SCHANDA, K.; ABOUL-ENEIN, F.; KHALIL, M.; STORCH, M.K.; JARIUS, S.; KRISTOFERITSCH, W.; BERGER, T.; REINDL, M. Patterns of antibody binding to aquaporin-4 isoforms I neuromyelitis optica. **PLoS One.**, v.5, n.5, p.e10455, 2010.

MANDLER, R.N.; DAVIS, L.E.; JEFFERY, D.R.; KORNFIELD, M. Devic's neuromyelitis optica: a clinicopathological study of 8 patients. **Ann Neurol.**, v.34, p.162-168, 1993.

MANDLER, R.; AHMED, W.; DENCOFF, J. Devic's neuromyelitis optica: A prospective study of seven patients treated with prednisone and azathioprine. **Neurol.**, v.51, p.1219-1220, 1998.

MANDLER, R.N.; DENCOFF, J.D.; MIDANI, F.; FORD, C.C.; AHMED, W.; ROSENBERG, G. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in cerebrospinal fluid differ in multiple sclerosis and devic's neuromyelitis óptica. **Brain**. v.124, p.493-498, 2001.

MARMETTO F, HELLIAS B, GRANIERI L, FRAU J, PATANELLA AK, NYTROVA P, SALA A, CAPOBIANCO M, GILLI F, BERTOLOTTA A. Western blot analysis for the detection of serum antibodies recognizing linear Aquaporin-4 epitopes in patients with Neuromyelitis Optica. **J Neuroimmunol.**, v.217, n.1-2, p.74-79, 2009.

MARTINS, J.D.1.; LIBERAL, J.; SILVA, A.; FERREIRA, I.; NEVES, B.M.; CRUZ, M.T. Autophagy and inflammasome interplay DNA **Cell Biol**. V.34,n.4, p.274-278, 2015.

MASAKI, H.; WAKAYAMA, Y.; HARA, H.; JIMI, T.; UNAKI, A.; IJIMA, S.; ONIKI, H.; NAKANO, K.; KISHIMOTO, K.; HIRAYAMA, Y. Immunocytochemical Studies of Aquaporin 4, Kir4.1, and α 1-syntrophin in the Astrocyte Endfeet of Mouse Brain Capillaries. **Acta Hist Cytoch.**, v.43, n.4, p.99-105, 2010.

MATSUSHITA, T.; ISOBE, N.; MATSUOKA, T.; SHI, N.; KAWANO, Y.; WU, X.M.; YOSHIURA, T.; NAKAO, Y.; ISHIZU, T.; KIRA, J.I. Aquaporin-4 autoimmune syndrome and anti-aquaporin-4 antibody-negative opticospinal multiple sclerosis in Japanese. **Mult Scler.**, v.15, p.834-847, 2009.

MATSUSHITA, T.; HORIKAWA, M.; IWATA, Y.; TEDDER, T.F. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. **J Immunol.**, v.185, n.4, p.2240, 2010.

MATSUYA, N.; KOMORI, M.; NOMURA, K.; NAKANE, S.; FUKUDOME, T.; GOTO, H.; SHIRAISHI, H.; WANDINGER, K.P.; MATSUO, H.; KONDO, T. Increased T-cell immunity against aquaporin-4 and proteolipid protein in neuromyelitis optica. **Internat Immunol.**, v.23, p.565-573, 2011.

MATTHEWS, L.; MARASCO, R.; JENKINSON, M.; KÜKER, W.; LUPPE, S.; LEITE, M.I.; GIORGIO, A.; DE STEFANO, N.; ROBERTSON, N.; JOHANSEN-BERG, H.; EVANGELOU, N.; PALACE, J. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution, **J Neurol.**, v. 80, n.14, p.1330-1337, 2013.

MAURI, C.; BLAIR, PA.; Regulatory B cells in autoimmunity: developments and -52 controversies. **Nat Rev Rheumatol.**, v.6, n.11, p.636-43, 2010.

MCGEACHY, M.J.; BAK-JENSEN, K.S.; CHEN, Y.; TATO, C.M.; BLUMENSCHNEIN, W.; MCCLANAHAN, T.; CUA, D.J. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nat Immunol.**, v.8, p.1390-1397, 2007.

MCKEON, A.; LENNON, V.A.; JACOB, A.; MATIELLO, M.; LUCCHINETTI, C.F.; KALE, N.; CHAN, K.H.; WEINSHENKER, B.G.; APIWATTINAKUL, M.; WINGERCHUK, D.M.; PITTOCK, S.J.; Coexistence of myasthenia gravis and serological markers of neurological autoimmunity in neuromyelitis optica. **Muscle Nerve.**, v.39, n.1, p. 87-90, 2009.

MCKINSTRY, K.K.; STRUTT, T.M.; SWAIN, S.L. The potential of CD4 T-cell memory. **Immunol.**, v.130, p.1-9, 2010.

MEDAWAR, P. B. Immunity to homologous grafted skin: III. Fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. **Br J Exp Pathol.**, v.29, p.58 – 69, 1948.

MIHARA, M.; HASHIZUME, M.; YOSHIDA, H.; SUZUKI, M.; SHIINA, M. Il-6/il-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clin Sci.**, v.22, p.143-159, 2012.

MILLONI, G. A.; HEGEN, H.; DI PAULI, F.; EHLING, R.; GNEISS, C.; HOELZL, M.; KÜNZ, B.; LUTTEROTTI, A.; RUDZKI, D.; BERGER, T.; REINDL, M.; DEISENHAMMER, F. Natalizumab treatment reduces endothelial activity in ms patients. **J Neuroimmunol.**, v.227, n.1-2, p.190-194, 2010.

MINOHARA, M.; OCHI, H.; MATSUSHITA, S.; IRIE, A.; NISHIMURA, Y.; KIRA, J. Differences between T-cell reactivities to major myelin protein-derived peptides in opticospinal and conventional forms of multiple sclerosis and healthy controls, **Tissue Ant.**, v.57, p.447-456, 2001

MISU, T.; FUJIHARA, K.; NAKAMURA, M.; MURAKAMI, K.; ENDO, M.; KONNO, H.; ITOYAMA, Y.; Loss of aquaporin-4 in active perivascular lesions in neuromyelitis optica: a case report. **J Exp Med.**, v.209, n.3, p.269-275, 2006.

MISU, T.; FUJIHARA, K.; KAKITA, A.; KONNO, H.; NAKAMURA, M.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, T.; NAKASHIMA, I.; TAKAHASHI, H.; ITOYAMA, Y.; Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. **Brain.**, v.130, p.1224-1234, 2007.

MOBASHERI, A.; MARPLES, D.; YOUNG, IS.; FLOYD, RV.; MOSKALUK, CA.; FRIGERI, A. Distribution of the AQP4 water channel in normal human tissues. **Channels**. v.1, n.1, p.29-38, 2007.

MORRIS, G.; BERK, M.; GALECKI, P.; WALDER, K.; MAES, M. The Neuro-Immune Pathophysiology of Central and Peripheral Fatigue in Systemic Immune-Inflammatory and Neuro-Immune Diseases. **Mol Neurobiol.**, 2015.

NAGELE, E.P.; HAN, M.; ACHARYA, N.K.; DEMARSHALL, C.; KOSCIUK, M.C.; NAGELE, R.G. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. **PLoS One**. v.8, n.4, p.e60726, 2013.

NAGELHUS, E.A.; VERUKI, M.L.; TORP, R.; HAUG, F.M.; LAAKE, J.H.; NIELSEN, S.; AGRE, P.; OTTERSEN, O.P. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. **J Neurosc.** v.18, p.2506-2519, 1998.

NAKASHIMA, I.; FUJIHARA, K.; MIYAZAWA, I.; MISU, T.; NARIKAWA, K.; NAKAMURA, M.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, S.; SHIGA, Y.; SATO, S.; WEINSHENKER, B.G.; ITOYAMA, Y. Clinical and MRI features of japanese patients with multiple sclerosis positive for NMO-IGG. **J Neurol Neurosurg Psychiatr.**, v.77, n.9, p.1073-1075, 2006.

NAKHOUL, N.; DAVIS, B.; ROMERO, M.; BORON, W.; Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO₂ permeability of Xenopus oocytes. **Am J Physiol.**, v.274, p.543-548, 1998.

NARAPORN, P.; ORASA, C.; WARAPORN, P.; CHANON, N.; JITSUPA, W.; SASITORN, S. MRI features and anti-AQP4 antibody status in Idiopathic inflammatory demyelinating CNS disease (IIDCD) in Thai patients. **Neurol Asia.**, v.18, n.1, p.73-81, 2013.

NEELY, J.D.; CHRISTENSEN, B.M.; NIELSEN, S.; AGRE, P.; Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. **Biochem.**, v.38, p.11156-11163, 1999.

NEELY, J.D.; AMIRY-MOGHADDAM, M.; OTTERSEN, O.P, et al. "Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein". **Proc. Natl Acad Sci USA.**, v.98, n.24, p.14108-14113, 2002.

NICCHIA, G.P.; COGOTZI, L.; ROSSI, A.; BOSCO, D.; BRANCACCIO, A.; SVELTO, M.; FRIGERI, A. Expression of multiple AQP4 pools in the plasma membrane and their association with the dystrophin complex. **J Neurochem.**, v. 105, p.2156-2165, 2008.

NICCHIA, G.P.; MASTROTORATO, M.; ROSSI, A.; PISANI, F.; TORTORELLA, C.; RUGGIERI, M.; LIA, A.; TROJANO, M.; FRIGERI, A.; SVELTO, M. Aquaporin-4 Orthogonal Arrays of Particles Are the Target for Neuromyelitis Optica Autoantibodies. **Glia.**, v.57, p.1363-1373, 2009.

NICCHIA, G.P.; ROSSI, A.; MOLA, M.G.; PISANI, F.; STIGLIANO, C.; BASCO, D.; MASTROTOTARO, M.; SVELTO, M.; FRIGERI, A. Higher order structure of aquaporin-4. **Neurosc.**, v.168, n.4, p.903-914, 2010.

NIELSEN, S.; NAGELHUS, E.A.; AMIRY-MOGHADDAM, M.; BOURQUE, C.; AGRE, P.; OTTERSEN, O.P. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. **J Neurosc.**, v.17, p.171-180, 1997.

OBAR, J.J.; LEFRANÇOIS, L. Memory CD8+ T-cell differentiation. **Ann NY Acad Sci.**, v.1183, p.251-266, 2010.

OLSEN, M.L.; SONTHEIMER, H. Functional implications for Kir4.1 channels in glial biology: from K⁺ buffering to cell differentiation. **J Neurochem.**, v.107, n.3, p. 589-601, 2008.

O'RIORDAN, J.I.; GALLAGHER, H.L.; THOMPSON, A.J.; HOWARD, R.S.; KINGSLEY, D.P.; THOMPSON, E.J.; MCDONALD, W.I.; MILLER, D.H. Clinical, CSF, and MRI findings in devic's neuromyelitis optica. **J Neurol Neurosurg Psychiatr**, v.60, n.4, p.382-387,1996.

PAPAI-ALVARENGA, R.M.; MIRANDA-SANTOS, C.M.; PUCCIONI-SOHLER, M.; DE ALMEIDA, A.M.; OLIVEIRA, S.; BASÍLIO DE OLIVEIRA, C.A.; ALVARENGA, H.; POSER, C.M. Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. **J Neurol Neurosurg Psych.**, v.73, p.429-435, 2002.

PAPAI-ALVARENGA, R.M. Mielite transversa aguda. In: **Emergências Clínicas.** Rio de Janeiro: RÚBIO, v.1, p. 523-532, 2006.

PAPAI-ALVARENGA, R.M.; CARELLOS, S.C.; ALVARENGA, M.P.; HOLANDER, C.; BICHARA, R.P.; THULER, L.C.S. clinical course of optic neuritis in patients with relapsing neuromyelitis optica. **Arch Ophthalmol.**, v.126, p.12-16, 2008.

PAPAI-ALVARENGA, R.M.; VASCONCELOS, C.C.; ALVES-LEON, S.V.; BATISTA, E.; SANTOS, C.M.; CAMARGO, S.M.; GODOY, M.; LACATIVA, M.C.; LORENTI, M.; DAMASCENO, B.; DAMASCENO, A.; BRUM, D.; BARREIRA, A.A.; GUIMARÃES ROCHA, M.S.; ALVARENGA, H.; TILBERY, C.P. The impact of diagnostic criteria for neuromyelitis optica in patients with MS: a 10-year follow-up of the South Atlantic Project. **Mult Scler**, v.20, n.3, p. 374-381, 2014.

PALMEIRA, P.; QUINELLO, C.; SILVEIRA-LESSA, A.L.; ZAGO, C. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. IgG Placental Transfer in Healthy and Pathological Pregnancies, **Clin Dev Immunol.**, v. 985646, 2012.

PETI-PETERDI; KIDOKORO, K.2; RIQUIER-BRISON. Novel in vivo techniques to visualize kidney anatomy and function. **Kidney Int.**, 2015.

PITTOCK, S.J.; WEINSHENKER, B.G.; LUCCHINETTI, C.F.; WINGERCHUK, D.M.; CORBOY, J.R.; LENNON, V.A. Neuromyelitis Optica brain lesions localized at sites of high Aquaporin 4 expression. **Arch Neuro**, v.63, n.7, p.964-968, 2006.

PITTOCK, S.J.; LENNON, V.A.; DE SEZE, J.; VERMERSCH, P.; HOMBURGER, H.A.; WINGERCHUK, D.M.; LUCCHINETTI, C.F.; ZEPHIR, H.; MODER, K.; WEINSHENKER, B.G. Neuromyelitis óptica and non-organ specific autoimmunity. **Arch Neurol.**, v.65, p.78-83, 2008.

POHL, M.; FISCHER, M.T.; MADER, S.; SCHANDA, K.; KITIC, M.; SHARMA, R.; WIMMER, I.; MISU, T.; FUJIHARA, K.; REINDL, M.; LASSMANN, H.; BRADL, M. Pathogenic T cell responses against aquaporin 4. **Acta Neuropathol**, v.122, n.1, p. 21-34, 2011.

RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat Rev Immunol.**, v.3, p.569-581, 2003.

RASH, J.E.; STAEHELIN, L. A, ELLISMAN, M.H. Rectangular arrays of particles on freeze-cleaved plasma membranes are not gap junctions. **Exp Cell Res.**, v.86, p.187-190, 1974.

RASH, J.E.; DAVIDSON, K.G.; YASUMURA, T.; FURMAN, C.S. Freeze-fracture and immunogold analysis of aquaporin-4 (AQP4) square arrays, with models of AQP4 lattice assembly. **Neurosci.**, v.129, p.915-934, 2004.

RIZVI, S.A.; AGIUS, M.A. Current approved options for treating patients with multiple sclerosis. **Neurol.**, v.63, p.S8-S14, 2004.

ROEMER, S.F.; PARISI, J.E.; LENNON, V.A.; BENARROCH, E.E.; LASSMANN, H.; BRUCK, W.; MANDLER, R.N.; WEINSHENKER, B.G.; PITTOCK, S.J.; WINGERCHUK, D.M.; LUCCHINETTI, C.F. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. **Brain.**, v.130, p.1194-1205, 2007.

ROMAGNANI, S. T. cell subpopulations. **Chem Immunol Allergy.**, v.100, p.155 -164, 2014.

ROSSI, A.; PISANI, F.; NICCHIA, G.P.; SVELTO, M.; FRIGERI, A. Evidences for a Leaky Scanning Mechanism for the Synthesis of the Shorter M23-Protein Isoform of Aquaporin-4: Implication in Orthogonal Array Formation and Neuromyelitis Optica Antibody Interaction. **J Biol Chem.**, v.285, n.7, p.4562-4569, 2010.

RUBARTELLI, A.; LOTZE, M. T. Inside, outside, upside, down: Damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPS) and redox. **Trends in Immunol.**, v.28, n.10, p.429-36, 2007.

SAADOUN, S.; WATERS, P.; BELL, A.; VINCENT, A.; VERKMAN, A.S.; PAPADOPOULOS, M.C. Intra-cerebral injection of neuromyelitis optica Immunoglobulin G and human complement Produces neuromyelitis optica lesions in mice. **Brain.**, v.133, p.349-361, 2010.

SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDÉS-FERRER, S.I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci.**, v.9, p.28, 2015.

SHIMIZU, F.; SANO, Y.; TAKAHASHI, T.; HARUKI, H.; SAITO, K.; KOGA, M.; KANDA, T. Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood-brain barrier. **J Neurol Neurosurg Psych.**, v.83, p.288-297, 2012.

SHWARTZMAN, G. Studies on bacillus typhosus toxic substances: i. Phenomenon of local skin reactivity to b. Typhosus culture filtrate. **J Exp Med.** v.48, n.2, p.247-268, 1928.

SILBERSTEIN, C.; BOULEY, R.; HUANG, Y.; FANG, P.; PASTOR-SOLER, N.; BROWN, D.; VAN HOEK, A.N. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. **Am J PhysiolRenal Physiol.**, v. 287, p.F501-F511, 2004.

SINCLAIR, C.; KIRK, J.; HERRON, B.; FITZGERALD, U.; MCQUAID, S. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. **Acta Neuropathol.**, v.113, p.187-194, 2007.

SIRITHO, S.; APIWATTANAKUL, M.; NAKASHIMA, I.; TAKAHASHI, T.; FUJIHARA, K.; PRAYOONWIWAT, N.J. Features of anti-aquaporin 4 antibody-seronegative Thai patients with neuromyelitis optica spectrum disorders: a comparison with seropositive cases. **Neurol Sci.**, v.341, n.1-2, p.17-21, 2014.

SMORODCHENKO, A.; WUERFEL, J.; POHL, E. E.; VOGT, J.; TYSIK, E.; GLUMM, R.; HENDRIX, S.; NITSCH, R.; ZIPP, F.; INFANTE-DUARTE, C. CNS-Irrelevant t-cells enter the brain, cause blood–brain barrier disruption but no glial pathology. **Eur J Neurosci.**, v.26, p.1387-1398, 2007.

SORENSEN, T.L.; TAN, I.M.; JENSEN, J.; PIERCE, V.; LUCCHINETTI, C.; FOLCIK, V.A.; QIN, S.; ROTTMAN, J.; SELLEBJERG, F.; STRIETER, R.M.; FREDERIKSEN, J.L.; RANSOHOFF, R.M. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. **J Clin Invest.**, v.103, n.6, p.807-815, 1999.

SPOLSKI, R.; LEONARD, W.J. IL-21 and T-follicular helper cells. **Intern Immunol.**, v.22, p.7-12, 2009.

STRAND, L.; MOE, S.E.; SOLBU, T.T.; VAADAL, M.; HOLEN, T. Roles of Aquaporin-4 Isoforms and Amino Acids in Square Array Assembly. **Biochim Biophys Acta.**, v.1792, p.5785-5793, 2009.

SU-YI, T.; MENGLING, L.; MICHAEL, L.D. CD80 cytoplasmic domain controls localization of CD28, CTLA-4 and PKC- θ in the immunological synapse. **J Immunol.**, v.175, n.12, p.7829-7836, 2005.

SUURMOND, J.; DIAMOND, B. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases: specificity and pathogenicity. **J Clin Invest.**, v.125, p.9, 2015.

SWANBORG, R.H. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: Lessons in t-cell immunology and autoreactivity. **Immunol Rev.**, v.184, p.129-135, 2001.

TAKAHASHI, T.; FUJIHARA, K.; NAKASHIMA, I.; MISU, T.; MIYAZAWA, I.; NAKAMURA, M.; WATANABE, S.; SHIGA, Y.; KANAOKA, C.; FUJIMORI, J.; SATO, S.; ITOYAMA, Y. Anti-aquaporin-4 antibody is involved in the pathogenesis of NMO: A study on antibody titre. **Brain.** v.130, p.1235-1243, 2007.

TANAKA, K.; TANAKA, M., Differential diagnosis of neuromyelitis optica spectrum disorders. **Brain Nerve**. v.62, n.9, p.953-960, 2010.

TANI, T.; SAKIMURA, K.; TSUJITA, M.; NAKADA, T.; TANAKA, M.; NISHIZAWA, M.; TANAKA, K. Identification of binding sites for anti-aquaporin 4 antibodies in patients with neuromyelitis optica. **J Neuroimmunol.**, v.211, p.110-113, 2009.

TINSLEY, J.M.; BLAKE, D.J.; ZUELLIG, R.A.; DAVIES, K.E. Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v.91, n. 18, p.8307-8313, 1994.

TOURTELLOTTE, W.W.; WALSH, M.J.; BAUMHEFNER, R.W.; STAUGAITIS, S.M.; SHAPSHAK, P. The current status of multiple sclerosis intra-blood-brain-barrier IgG synthesis. **Ann N Y Acad Sci.**, v.436, p.52-67, 1984.

UEHLEIN, N.; LOVISOLO, C.; SIEFRITZ, F.; KALDENHOFF, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. **Nat.**, v. 425, p.734-737, 2003.

VAN HOEK, A.N.; MA, T.; YANG, B.; VERKMAN, A.S.; BROWN, D. Aquaporin-4 is expressed in basolateral membranes of proximal tubule S3 segments in mouse kidney. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 278, F310–F316, 2000.

VERKMAN, A.S. More than just water channels: Unexpected cellular roles of aquaporins. **J Cell Sci.**, v.118, p.3225-3232, 2005.

VERKMAN, A.S.; RATELADE, J.; ROSSI, A.; ZHANG, H.; TRADTRANTIP, L. Aquaporin-4: orthogonal array assembly, CNS functions, and role in neuromyelitis optica. **Acta Pharmacol Sin.**, v.32, n.6, p.702-710, 2011.

VIRLEY, D.J. Developing therapeutics for the treatment of multiple sclerosis. **J Am Soc Exp Neuro Theraps.**, v.2, p.638-649, 2005.

VON HEIJNE, G. Membrane-protein topology. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.7, p.909-918, 2006.

WANG, Y.; COHEN, J.; BORON, W.F.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. **J Struct Biol.**, v.157, p.534-544, 2007.

WANG, K.C.; TSAI, C.P.; LEE, C.L.; CHEN, S.Y.; CHEN, S.J. The prevalence of long spinal cord lesions and anti-aquaporin 4 antibodies in neuromyelitis optica patients in Taiwan. **Eur Neurol.**, v. 65, n.2, p.99-104, 2011a.

WANG, H.H.; DAI, Y.Q.; QIU, W.; LU, Z.Q.; PENG, F.H.; WANG, Y.G. Interleukin-17-secreting T-cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse. **J Clin Neurosc.**, v.18, p.1313-1317, 2011b.

WARABI, Y.; YAGI K.; HAYASHI; H. ; MATSUMOTO, Y. Characterization of the T cell receptor repertoire in the Japanese neuromyelitis optica: T cell activity is upregulated compared to multiple sclerosis. **J Neurol Sci.**, v.249, p.145-152, 2006.

WATTS, C.; ZARU, R.; PRESCOTT, A.R.; WALLIN, R.P.; WEST, M.A. Proximal effects of toll-like receptor activation in dendritic cells. **Curr Op Immunol.**, v.19, p. 73-78, 2007.

WEEINSHENKER, B.G. Plasma exchange for severe attacks of inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. **J Clin Apheresis.**, v.16, p.39-42, 2001.

WEINSTOCK-GUTTMAN, B.; MILLER, C.; YEH, E.; STOSIC, M.; UMHAUER, M.; BATRA, N.; MUNSCHAUER, F.; ZIVADINOV, R.; RAMANATHAN, M. Neuromyelitis optica immunoglobulins as a marker of disease activity and response to therapy in patients with neuromyelitis optica. **Mult Scler.**, v.14, n. 8, p. 1061-1067, 2008.

WELLER, R. O.; ENGELHARDT, B.; PHILLIPS, M. J. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. **Brain Pathol.**, v.6, p.275-288, 1996.

WESTLAND, K.W.; POLLARD, J.D.; SANDER, S.; BONNER, J.G.; LININGTON, C.; MCLEOD, J.G. Activated non-neural specific t cells open the blood brain barrier to circulating antibodies. **Brain.** v.122, p. 1283-1291, 1999.

WINGERCHUK, D. M.; HOGANCAMP, W. F.; O'BRIEN, P.C.; WEINSHENKER, B. G. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's Syndrome). **Neurol.**, v.53, p.1107-1114, 1999.

WINGERCHUK, D.M.; LENNON V.A.; PITTOCK SJ, LUCCHINETTI CF, WEINSHENKER, B.G. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. **Neurol.**, v. 66, n.10, p.1485-1489, 2006.

WINGERCHUK, D.; LENNON, V.; LUCCHINETTI, C.; PITTOCK, S.; WEINCHENKER, B. The spectrum of neuromyelitis optica. **Lancet Neurol.**, v.6, p. 805-815, 2007.

YANG, B.; VAN HOEK, A. N.; VERKMAN, A.S. Very high single channel water permeability of aquaporin-4 in baculovirus-infected insect cells and liposomes reconstituted with purified aquaporin-4. **Bioch.**, v.36, p.7625-7632, 1997.

YANG, Y.; HUANG, D.H.; WU, W.P.; WU, L.; CHEN, L.F.; WU, Q. The role of aquaporin-4 antibodies in Chinese patients with neuromyelitis optica. **J Clin Neurosci.**, v.20, n.1, p.94-98, 2013.

YEDNOCK, T.A.; CANNON, C.; FRITZ, L.C.; SANCHEZ-MADRID, F.; STEINMAN, L.; KARIN, N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha-4 beta-1 integrin. **Nat.**, v.356, n.6364, p.63-66, 1992.

YOOL, A.J.; WEINSTEIN, AM. New roles for old holes: ion channel function in aquaporin-1. **News Physiol Sci.**, v.17, p.68-72, 2002.

YOU, X.F.; YE, J.; LI, C.J.; LIAO, Z.Y.; SUN, H. Neuromyelitis optica IgG and related clinical features of patients with neuromyelitis optica. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.** v.90, n.35, p.2477-2480, 2010.

YU, J.; YOOL, A.J.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. Mechanism of gating and ion conductivity of a possible tetrameric pore in Aquaporin-1. **Struct.**, v.14, p.1411-2143, 2006.

YU, X.; GREEN, M.; GILDEN, D.; LAM, C.; BAUTISTA, K.; BENNETT, J.L. Identification of peptide targets in neuromyelitis optica. **J Neuroimmunol.**, v.236, n.1-2, p.65-71, 2011.

YURCHENCO, P.D. Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v.3, n.2, 2011

ZARDOYA, R.; VILLALBA, S. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. **J Mol Evol.**, v.52, n.5, p.391-404, 2001.

ZHANG, R.; LI, Q.; CHUANG, PY.; LU, G.; LIU, R.; YANG, J.; PENG, L.; DAI, Y.; ZHENG, Z.; QI, C.F.; HE, J.C.; XIONG, H. Regulation of pathogenic Th17 cell differentiation by IL-10 in the development of glomerulonephritis. **Am J Pathol.**, v.183, n.2, p.402-412, 2013.

ZHOU, L.; IVANOV, I.I.; SPOLSKI, R.; MIN, R.; SHENDEROV, K.; EGAWA, T.; LEVY DE, LEONARD, W.J.; LITTMAN, D.R . IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nat Immunol.**, v.8, P.967-974, 2007.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W.E. Differentiation of effect or CD4 T-cell populations. **Ann Rev Immunol**, v.28, p.445-489, 2010.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA
MESTRADO EM NEUROLOGIA

Título do Projeto

FREQUENCIA DA POSITIVIDADE DO ANTICORPO IGGNMO E SUA INFLUENCIA NO CURSO CLINICO - ANÁLISE DE UMA COORTE DE PACIENTES DO RIO DE JANEIRO

Investigador Principal: Professora Doutora Regina Maria Papais Alvarenga –
Professora de Neurologia da UNIRIO. Tel.: 22642123.

EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES

1. Propósito do estudo

O propósito deste estudo é avaliar a frequência dos anticorpos anti-aquaporina-4 em pacientes com neuromielite óptica e discutir o seu papel na imunopatogênese da enfermidade. Visa ainda destacar, mediante as análises das correlações clínicas, se esses anticorpos dotados de alta especificidade para a AQP-4 podem funcionar como marcador (preditor) de gravidade para a NMO.

2. Procedimentos

Durante a consulta clínica com o médico, uma vez estabelecido o diagnóstico de NMO, o médico fará algumas perguntas de relevância para o nosso estudo. Essas perguntas objetivam avaliar relatos de intercorrências clínicas de relevância imunológica, tais como o número de episódios de surtos ao ano, ocorrência de reações alérgicas e de outras imunopatologias, com definição do tipo de desordem imunológica de fundo autoimune. Após a entrevista, e com o consentimento oral e

por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa e quantitativa dos anticorpos anti-AQP4.

3. Riscos e desconfortos

A aplicação das perguntas não oferece nenhum tipo de risco ou desconforto. Caso você esteja se sentido desrespeitado, pode interrompê-lo a qualquer momento. A obtenção do sangue periférico será conduzida por seu médico e utilizará todo o material sob condições adequadas.

4. Benefícios

Os resultados obtidos pelo estudo serão analisados pelo nosso grupo. Estes resultados poderão fornecer informações importantes relacionadas à NMO. Mas, eles podem não lhe trazer benefícios imediatos, desde que são necessários vários anos de estudos em um número elevado de pacientes. No entanto, caso os achados sejam significativos, o seu médico terá acesso a todos eles e poderá, caso julgue necessário, apresentá-los a você.

5. Alternativas para a participação

Sua participação nesse estudo é voluntária. Você poderá interromper a entrevista ou não permitir a coleta de seu sangue a qualquer momento, sem nenhum problema para você. Você também poderá se retirar do estudo a qualquer momento sem nenhum prejuízo quanto ao seu atendimento pela equipe médica hospitalar.

6. Custos e compensações

Você não pagará nada para participar nesse estudo. Você não será pago por estar no estudo.

7. Confidenciabilidade

Este estudo envolve informações confidenciais. Essas informações serão mantidas estritamente confidenciais entre os membros envolvidos na pesquisa. Qualquer publicação científica dos resultados não identificará você.

8. Direito de se retirar da pesquisa

Sua participação é voluntária. Você não é obrigado a participar nessa pesquisa. Você é livre para interromper a qualquer momento sua participação.

9. Perguntas ou problemas

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dra. Regina Maria Papais Alvarenga (tel.: 2264-2123) ou Dra. Camila Rodrigues de Almeida (tel.: 2264-2123).

10. Consentimento

Uma vez que você leu (ou lhe foi explicado) e entendeu o propósito desse estudo, os procedimentos que serão realizados, os riscos e benefícios, e você **VOLUNTARIAMENTE** concorda em fazer parte desse estudo, favor assinar seu nome abaixo.

Nome do Indivíduo entrevistado: _____

Assinatura do Indivíduo entrevistado

Eu expliquei o propósito do estudo para o paciente. Ao meu entender, ela entendeu o propósito, procedimentos, riscos e benefícios desse estudo.

Nome do Investigador: _____

Assinatura do Investigador

Nome da testemunha: _____

Assinatura da Testemunha

Data: RJ, ___/___/20__.