



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO BIOMÉDICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR E
CELULAR

JÚLIO CÉSAR COSTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DAS CÉLULAS B DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA: COMPARAÇÃO
COM OS TRANSTORNOS DO ESPECTRO DA
NEUROMIELITE ÓPTICA**

RIO DE JANEIRO

2025

JÚLIO CÉSAR COSTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DAS CÉLULAS B DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA: COMPARAÇÃO
COM OS TRANSTORNOS DO ESPECTRO DA
NEUROMIELITE ÓPTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Cleonice Alves de Melo Bento.

Coorientador: Lana Márcia Ferreira Lopes.

RIO DE JANEIRO

2025

C586

Costa da Silva, Júlio César
AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DAS CÉLULAS B DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA: COMPARAÇÃO COM OS
TRANSTORNOS DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA / Júlio
César Costa da Silva. -- Rio de Janeiro : UNIRIO, 2025.
119

Orientadora: Cleonice Alves de Melo Bento.
Coorientadora: Lana Márcia Ferreira Lopes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular e Celular, 2025.

1. Células B. 2. Esclerose múltipla. 3. Transtornos do
espectro da neuromielite óptica . I. Alves de Melo Bento,
Cleonice , orient. II. Ferreira Lopes, Lana Márcia ,
coorient. III. Título.

JÚLIO CÉSAR COSTA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DAS CÉLULAS B DE
PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA: COMPARAÇÃO
COM OS TRANSTORNOS DO ESPECTRO DA
NEUROMIELITE ÓPTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Molecular e Celular da Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro como parte dos
requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Rio de Janeiro, 21 de Agosto de 2025.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dr.^a Cleonice Alves de Melo Bento – Doutora em Ciências
(Imunologia), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro,
UNIRIO, Brasil.

Prof. Dr. Cassiano Felipe Gonçalves de Albuquerque – Doutor em
Biologia (Biociências Nucleares), Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brasil.

Prof. Dr. Erick Esteves de Oliveira – Doutor em Ciências Biológicas,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil.

Dedico este trabalho, antes de tudo, aos pacientes que, mesmo tocados pela dor, não permitem que ela lhes adoeça a alma. À minha família, à minha companheira, aos amigos que caminharam comigo, e à sociedade brasileira — que, apesar de suas feridas, ainda sonha — ofereço também esta conquista, feita de fé, ciência e afeto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus ancestrais, que trilharam caminhos antes de mim e tornaram possível a minha existência e trajetória.

Aos meus pais, Adilson e Cintia, por construírem com dedicação as bases para minha formação técnica, ética e moral.

À minha irmã, Camila, que me inspira diariamente com sua força e resiliência.

À minha companheira, Giovanna Arêas, por dividir comigo todos os momentos, descobertas e sonhos ao longo do caminho.

À Elvira Arêas, minha sogra, por me acolher com carinho e por tantos momentos de afeto e aprendizado.

Aos meus tios – Ana, Ricardo, Luanda, Júlia e Herme – pelo constante incentivo e confiança.

Aos meus avós – Anamyr, José, Edir, Geraldo, Eva e Hermenegildo – por me ensinarem a olhar o mundo com ternura e amor.

Ao Lar de Caridade João da Oração, por me lembrar diariamente dos valores que sustentam a humanidade e da nossa responsabilidade perante o outro.

Aos meus amigos André, João e Malkai, por compartilharem comigo vivências.

Ao Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T (LIILiT) e a todos os seus integrantes, por colaborarem de forma tão significativa com meu crescimento técnico, pelo acolhimento e pelos laços de amizade criados ao longo do tempo.

À minha orientadora, Cleonice Alves de Melo Bento, pela generosa partilha de saberes e por oferecer os alicerces que sustentaram meu amadurecimento como cientista e como pessoa.

À minha coorientadora, Lana Márcia Ferreira Lopes, por me acolher com generosidade ao longo da minha trajetória acadêmica. Sou profundamente grato pelas discussões instigantes, pela escuta atenta e pela valiosa partilha de tempo e conhecimento durante o desenvolvimento deste projeto.

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro e a todos os seus funcionários – tanto servidores quanto terceirizados – por garantirem uma formação acadêmica e científica de excelência.

“ÀSE PÚPÒ ÀTI KI OLÓÒRUN ÀÁ GBÈÉ WA”

— Provérbio tradicional iorubá (tradução livre: Muito axé, e que Deus
abençoe nossas vidas.)

RESUMO

Caracterizadas tanto pela destruição da mielina quanto a degeneração axonal, as doenças autoimunes desmielinizantes (DAD) do sistema nervoso (SNC) manifestam lesões consideradas típicas associadas à neuroinflamação fomentada por células imunes inatas (micróglia/macrófagos) e adaptativas (linfócitos T e B) dirigidas contra antígenos expressos tanto pelos neurônios quanto por células locais acessórias, os oligodendrócitos e astrócitos. Dentre as principais DAD do SNC, a Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (EMRR) é a mais prevalente, porém, não a mais grave. Apesar de ser menos comum, pacientes com diagnóstico de Transtorno do Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD) possui pior desfecho, sendo essa relação associada à maior contribuição de células B. Apesar da EMRR ser considerada uma DAD mediada principalmente por subtipos de células T IL-17⁺ autorreativas, recentemente, células B têm associada à progressão da EMRR para a forma secundária progressiva, caracterizada por neurodegeneração irreversível. Levando-se em consideração a existência de subtipos células B, o presente estudo tem como objetivo mapear subtipos imunogênicos e tolerogênicos de células B circulantes nesses pacientes e comparar com a gravidade clínica da EM e da NMOSD. Para tanto, culturas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com EM (n=21), NMOSD (n=21) e de indivíduos saudáveis (controle, n=10) foram estimuladas com PMA e Ionomicina na presença de Brefeldina. Após 4 horas, a porcentagem de diferentes subtipos de células B (CD19⁺), com base na expressão diferencial de CD27, CD38, CD138, HLA-DR, IgD, CCR9 e $\alpha_4\beta_7$, assim como das citocinas IL-10 e IL-17, foi determinada por citometria de fluxo. A gravidade das incapacidades neurológicas foi determinada pela escala do EDSS. No presente estudo, uma redistribuição das células B transicionais foi observada, com redução dos fenótipos HLA-DR⁺IgD⁺ nos grupos EM e NMOSD e aumento do subtipo HLA-DR⁺IgD⁻ no grupo NMOSD, sugerindo um possível desbalanço imunológico relacionado à perda da homeostase. Nas amostras de NMOSD, células B de memória (CD27⁺CD38⁻HLA-DR⁺IgD⁻) mostraram correlação positiva com o grau de incapacidade, apontando esse subtipo como possível precursor de plasmoblastos patogênicos. Com relação aos

plasmoblastos, a frequência do fenótipo celular mais funcional (CD138⁺) não apenas foi maior nos grupos de pacientes, como também se mostrou positivamente correlacionada com a gravidade das incapacidades neurológicas. Ainda, em pacientes com NMOSD, maiores frequências de células B totais e plasmoblastos HLA-DR⁺IgD⁻ também se associaram à gravidade da doença. No paciente com EM, a proporção de alguns subtipos de células B CCR9⁺α₄β₇⁺ foi positivamente correlacionada aos níveis plasmáticos de LBP, um marcador indireto de transmigração bacteriana. Em contraste, de uma maneira geral, tanto a proporção de alguns subtipos de células B CCR9⁺α₄β₇⁻ e, principalmente, a intensidade de expressão de CCR9 sobre as células B correlacionou-se diretamente com LBP. Por fim, menor porcentagem de células B IL-10⁺IL-17⁻ foi observada em pacientes com NMOSD, enquanto células B IL-10⁻IL-17⁺, especialmente do subtipo de memória (CD27⁺CD38⁻), estavam aumentadas nesse grupo de pacientes. Apesar de preliminares, nossos achados sugerem que distúrbios na composição das células B circulantes possuem semelhanças e diferenças entre os ambos os grupos de pacientes, destacando-se uma maior expansão de células B pró-inflamatórias no grupo NMOSD.

Palavras-chave: SNC; EM; NMOSD; células B.

ABSTRACT

Evaluation of the Phenotypic Profile of B Cells in Patients with Multiple Sclerosis: Comparison with Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders

Characterized by both myelin destruction and axonal degeneration, demyelinating autoimmune diseases (DAD) of the central nervous system (CNS) present with typical lesions associated with neuroinflammation driven by innate immune cells (microglia/macrophages) and adaptive immune cells (T and B lymphocytes) targeting antigens expressed by neurons as well as by local accessory cells, oligodendrocytes and astrocytes. Among the main CNS DADs, relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) is the most prevalent, though not the most severe. Although less common, patients diagnosed with neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) have poorer outcomes, a finding associated with a greater contribution of B cells. While RRMS is considered a DAD primarily mediated by IL-17⁺ autoreactive T cell subtypes, recent studies have linked B cells to the progression of RRMS to the secondary progressive form, characterized by irreversible neurodegeneration. Considering the existence of B cell subtypes, the present study aims to map immunogenic and tolerogenic subtypes of circulating B cells in these patients and compare them with the clinical severity of MS and NMOSD. For this purpose, peripheral blood mononuclear cell cultures from patients with MS (n=21), NMOSD (n=21), and healthy individuals (controls, n=10) were stimulated with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin. After 4 hours, the percentage of different B cell subtypes (CD19⁺), based on the differential expression of CD27, CD38, CD138, HLA-DR, IgD, CCR9, and $\alpha 4\beta 7$, as well as the cytokines IL-10 and IL-17, was determined by flow cytometry. Neurological disability severity was assessed using the EDSS scale. In the present study, a redistribution of transitional B cells was observed, with a reduction of HLA-DR⁺IgD⁺ phenotypes in both MS and NMOSD groups and an increase in the HLA-DR⁺IgD⁻ subtype in the NMOSD group, suggesting a possible immunological imbalance related to the loss of homeostasis. In NMOSD samples, memory B cells (CD27⁺CD38⁻HLA-DR⁺IgD⁻) showed a positive correlation with the degree of disability, indicating this subtype as a

potential precursor of pathogenic plasmablasts. Regarding plasmablasts, the frequency of the most functionally active cell phenotype (CD138⁺) was not only higher in the patient groups but also positively correlated with the severity of neurological disabilities. Additionally, in NMOSD patients, higher frequencies of total B cells and HLA-DR⁺IgD⁻ plasmablasts were also associated with disease severity. In MS patients, the proportion of certain CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ B cell subtypes positively correlated with plasma LBP levels, an indirect marker of bacterial translocation. In contrast, in general, both the proportion of certain CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ B cell subtypes and, more notably, the intensity of CCR9 expression on B cells directly correlated with LBP. Finally, a lower percentage of IL-10⁺IL-17⁻ B cells was observed in NMOSD patients, whereas IL-10⁻IL-17⁺ B cells, particularly the memory subtype (CD27⁺CD38⁻), were increased in this patient group. Despite being preliminary, our findings suggest that disturbances in the composition of circulating B cells show both similarities and differences between the two patient groups, with a greater expansion of pro-inflammatory B cells in the NMOSD group.

Keywords: CNS; MS; NMOSD; B cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke.	26
Figura 2. Visão geral da patogênese da NMOSD	30
Figura 3. Fisiopatologia da Esclerose Múltipla e o papel das células Th17, T CD8 ⁺ e células B.	31
Figura 4. Maturação das células B humanas e seus marcadores superficiais.	34
Figura 5. Sinalização entre o sistema imunológico e sistema nervoso central em um contexto de eubiose e disbiose.....	41
Figura 6. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	50
Figura 7. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos que expressam HLA-DR e IgD em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	52
Figura 8. Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores HLA-DR e IgD nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	54
Figura 9. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos que expressam.	56
Figura 10. Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores CCR9 e $\alpha_4\beta_7$ nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	58
Figura 11. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos produtores de citocinas IL-10 e IL-17 em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	60
Figura 12: Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores IL-10 e IL-17 nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da população estudada.....	48
Tabela 2. Correlação entre os subtipos de células B e o grau de incapacidade neurológica (EDSS) em pacientes com EM e NMOSD.	64
Tabela 3. Correlação entre subtipos de células B e os níveis plasmáticos de LBP em pacientes com EM e NMOSD.	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Anticorpos utilizados para a marcação e identificação de linfócitos B, assim como suas subpopulações, derivados do sangue periférico.....	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADEM – Encefalomielite Aguda Disseminada

AMPs – do inglês, antimicrobial peptides

Anti-AQP4 – Anticorpo anti-aquaporina 4

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AQP4 – Aquaporina 4

ASC – do inglês, antibody-secreting cells

BBB – do inglês, blood-brain barrier

BHE – Barreira hematoencefálica

BOCs – Bandas Oligoclonais

CD – do inglês, cluster of differentiation

CIS – do inglês, Clinically isolated syndrome

CMSP – Células Mononucleares do Sangue Periférico

CNS – do inglês, Central Nervous System

CXCL – do inglês, chemokine (C-X-C motif) ligand

DAMPs – padrões moleculares associados ao dano

DMF – dimetilfumarato

EAAT2 – do inglês, excitatory aminoacid transporter-2

EDSS – do inglês, Expanded Disability Status Scale

eFLS – do inglês, ectopic lymphoid follicles

ELISA – do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EM – Esclerose Múltipla

EMPP – Esclerose Múltipla Primária Progressiva

EMRR – Esclerose Múltipla Remitente Recorrente

EMSP – Esclerose Múltipla Secundária Progressiva

FDA – do inglês, Food and Drug Administration

FDC – do inglês, follicular dendritic cell

FGL – fingolimóide

FS – do inglês, Functional Systems

GALT – do inglês, gut-associated lymphoid tissue

GC – do inglês, Germinative Center

GM-CSF – do inglês, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

HFL – Hospital Federal da Lagoa

HLA – do inglês, human leukocyte antigens

HLA-DR – do inglês, human leukocyte antigen-DR isotype

HUGG – Hospital Universitário Gaffrée e Guinle

IFN – interferon

IFN- γ – interferon-gama

IgG – Imunoglobulina do tipo G

IgG1 – Imunoglobulina do tipo G subclasse 1

IL – Interleucina

INPD – do inglês, International Panel for NMO Diagnosis

IO – Isonomicina

LIILiT – Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T

LPS – lipopolissacarídeo

LT- α – Linfotoxina- α

MAC – do inglês, Membrane Attack Complex

MAMPs – do inglês, microorganism-associated molecular patterns

MEDA – do inglês minimal evidence of disease activity

MMP9 – metalopeptidase da matriz 9

MOGAD – Doença Associada ao Anticorpo contra a Glicoproteína de Oligodendrócitos da Mielina

MOG – glicoproteína da mielina de oligodendrócitos

MS – do inglês, Multiple Sclerosis

MTA – Mielite Transversa Aguda

NEDA – do inglês, no evidence of disease activity

NF- κ B – do inglês, factor nuclear kappa B

NMO – Neuromielite Óptica

NMOSD – Transtorno do Espectro da Neuromielite Óptica

NO – Neurite Óptica

PAMPs – do inglês, pathogen-associated molecular patterns

PBMC – do inglês, peripheral blood mononuclear cells

PCDT – Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas

PMA – Forbol 12-miristato 13-acetato

PRRs – do inglês, pattern recognition receptors

RIS – do inglês, Radiologically isolated syndrome

RMN – Ressonância magnética nuclear

RPMI – do inglês, Roswell Park Memorial Institute

RR – Remitente Recorrente

SCFAs – do inglês, short-chain fatty acids

SFB – do inglês, segmented filamentous bacteria

SNC – Sistema nervoso central

T_{FH} – células T foliculares

TGF- β – do inglês, transforming growth fator β

Th – do inglês, T helper

TMD – Terapias modificadora da doença

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α

T_{reg} – T reguladora

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa

β - beta

γ - gama

κ - kappa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1. Considerações gerais.	22
1.2. Esclerose Múltipla e NMOSD – fatores epidemiológicos e clínicos.....	23
1.3. Imunopatogênese da NMOSD	27
1.4. Imunopatogênese da Esclerose Múltipla.	30
1.4.1. Células Th1, Th17 e células B na Esclerose Múltipla.	31
1.4.2. Os subtipos de linfócitos B circulantes e o seu papel na imunopatologia da Esclerose Múltipla.	33
1.5. Tratamento da Esclerose Múltipla e da NMOSD	35
1.6. Eixo cérebro-intestino e o sistema imunológico.....	37
1.7. Disbiose, desregulação imune e as doenças autoimunes desmielinizantes do SNC: breve descrição.	38
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivos gerais.	42
2.2. Objetivos específicos.	42
3. METODOLOGIA.....	43
3.1. Pacientes.	43
3.2. Obtenção do plasma e células mononucleares do sangue periférico.....	43
3.3. Análise por citometria de fluxo.....	44
3.4. Técnica Cell-based assay (CBA).....	45
3.5. Quantificação de LBP por ELISA tipo sanduíche.	46
3.6. Análise estatística.	46
4. RESULTADOS	48

4.1. Características da população estudada.....	48
4.2. Avaliação fenotípica dos subtipos de células B circulantes de pacientes acometidos com EM e NMOSD.....	49
4.3. Impacto da EM e da NMOSD na frequência de diferentes subtipos de células B com expressão diferencial de HLA-DR e IgD.....	51
4.4. Avaliação da frequência de células B circulantes que expressam CCR9 e a integrina $\alpha_4\beta_7$ em pacientes acometidos com EM e NMOSD.	55
4.5. Impacto da EM e da NMOSD na frequência de células B que produzem IL-10 e IL-17.....	59
4.6. Correlação entre subtipos de células B e a incapacidade neurológica em pacientes com EM e NMOSD.	63
4.7. Correlação entre subtipos de células B e os níveis plasmáticos de LBP em pacientes com EM e NMOSD.	68
5. DISCUSSÃO.....	75
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais.

Definidas pela degeneração axonal e progressiva deterioração da mielina, as doenças desmielinizantes autoimunes (DAD) apresentam lesões consideradas singulares relacionados à ativação de micróglia/macrófagos, astrócitos e linfócitos, considerados agentes propulsores da desmielinização e axonopatia na neuroinflamação. Responsáveis inicialmente pela injúria à bainha de mielina, essas células prejudicam a condução elétrica neuronal e, conseqüentemente, fomentam danos irreversíveis as funções sensitivas e motoras dos pacientes acometidos (DA SILVA et al., 2022; NAVE; WERNER, 2014; LOVE, 2006). Em ordem decrescente de importância epidemiológica, a esclerose múltipla (EM) e o transtorno do espectro da neuromielite óptica (NMOSD, do inglês neuromyelitis optic spectrum disorder) são as principais DAD que afetam a população (ROSENTHAL; HOFFMAN; TYOR, 2020; LEITE; SATO, 2020). Enquanto EM tem sido descrita como uma doença autoimune de base celular, a patogênese da NMOSD envolve principalmente a produção de anticorpos patogênicos dirigidos principalmente contra a proteína aquaporina-4 (APQ-4), respectivamente.

A respeito do curso clínico, grande parte dos pacientes acometidos com EM evoluem para a forma remitente recorrente (EMRR), descrita como uma condição cujo indivíduo apresenta episódios agudos de incapacidade neurológica seguida de remissão clínica parcial ou total. Em uma perspectiva temporal longa, entre 10 e 15 anos após o diagnóstico da EMRR, aproximadamente de 50% desses pacientes evoluem para a fase progressiva secundária (EMPS), sendo essa caracterizada por uma desmielinização progressiva e neurodegeneração irreversíveis. Apresenta ao longo desse curso manifestações clínicas como neurite óptica, síndrome do tronco cerebral, síndrome cerebelar ou síndrome da medula espinhal com fraqueza dos membros e/ou perda sensorial (ROSENTHAL; HOFFMAN; TYOR, 2020; BROWNLEE et al., 2017; MCFARLIN; MCFARLAND, 1982). Apesar do NMOSD ser uma condição mediada por autoanticorpos, ambas possuem aspectos patológicos e clínicos distintos entre si e entre a EM. Dessa forma, o NMOSD manifesta como

aspectos clínicos neurite óptica, mielite aguda longitudinalmente extensiva, síndrome da área postrema e/ou tronco cerebral e sintomas diencefálicos e cerebrais (WINGERCHUK et al., 2015).

Dentre as duas DAD, pacientes com NMOSD soropositivos anti-AQP4 são considerados mais graves com cerca de 50% desses pacientes apresentando amaurose, dependência de cadeiras de rodas e óbito cinco anos após o primeiro surto (LEITE; SATO, 2020; PITTOCK et al., 2008). Essa gravidade tem sido associada a destruição maciça das células que expressão elevada níveis de anticorpos anti-AQP4, os astrócitos. De forma interessante, apesar de vários estudos apontarem o envolvimento maior de subtipos de células T IL-17⁺ em coordenar a desmielinização primária da EMRR (KHAN, A.W.; FAROOQ, M.; HWANG, M.-J. et al., 2023; MILOVANOVIC, J., ARSENIJEVIC, A., STOJANOVIC, B. et al., 2020), a existência de estruturas denominadas de folículos ectópicos, ricos em células B, localizadas inferiormente às meninges de pacientes acometidos com as formas progressivas da EM indica uma possível participação da imunidade humoral na fase mais agressiva da doença, caracterizada por neurodegeneração. Entretanto, mesmo na EM, alguns estudos têm demonstrado o papel protetor das células B na doença (Kumar e Axtell, 2023), indicando a necessidade de estudos refinados para ao menos mapear a relação entre presença de diferentes células B com a gravidade das DAD, o que tem sido o objetivo do presente trabalho.

1.2. Esclerose Múltipla e NMOSD – fatores epidemiológicos e clínicos.

Caracterizada habitualmente por ataques regulares à bainha de mielina em indivíduos que apresentam uma predisposição genética para tal condição, a EM é classificada como uma enfermidade autoimune inflamatória crônica, sendo responsável por impactar negativamente a homeostase do SNC (ADAMS, R.D.; VICTOR, M.1998; SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. 2005). A respeito de sua epidemiologia, a EM afeta principalmente indivíduos entre 20 (vinte) e 50 (cinquenta) anos, assim, impactando negativamente as diversas esferas sociais

e profissionais presentes na vida desses (LEVIN et al., 2014). Estima-se que a EM afeta 2,8 milhões no mundo, com prevalência média de 19 casos por 100.000 brasileiros, com variação de 1,36 casos no Nordeste a 27,2 casos no Sul e Sudeste (KOBELT et al, 2019, MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION, 2022). A doença acomete duas a três vezes mais o gênero feminino quando comparado ao masculino (3:1) e indivíduos caucasianos (ALVES- LEON et al., 2008; ABEM, 2017).

A manifestação clínica na EM encontra-se relacionada ao ambiente inflamado, dessa maneira, condições derivadas dessa ação inflamatória são responsáveis pela multiplicidade de sinais e sintomas relacionadas às incapacidades neurológicas, podendo o seu caráter crônico levar ao desenvolvimento de atrofia cerebral e degeneração axonal secundária (SUPPIEJ, A.; CAINELLI, E. 2014). Dentre essas manifestações, destacam-se alterações da sensibilidade, perda visual, fraqueza muscular, motora, diplopia, ataxia dos membros e declive cognitivo. Diante desse contexto, apesar da EM apresentar a sua classificação como uma doença desmielinizante que acomete o SNC, em seu estágio avançado, é possível observar a sobreposição de diversos processos patológicos, tais como a perda da integridade da barreira hematoencefálica (BHE), inflamação em localidades heterogêneas, carência e esgotamento de oligodendrócitos, gliose reativa e degeneração axonal e neuronal (SCOLDING, 2015).

O diagnóstico definitivo da EM depende da ocorrência de ao menos 2 (dois) recaídas com intervalo temporal de no mínimo 1 (um) mês entre as recidivas, acompanhado de dois exames de imagem por ressonância magnética nuclear (RMN) revelando duas ou mais lesões neuronais em diferentes níveis topográficos da substância branca presente no SNC e compatíveis com as crises de incapacidade neurológica. Todavia, não raro, o fechamento de diagnóstico pode demorar, visto que alguns pacientes apresentam relato comprovado apenas de 1 (um) episódio recaída clínica, conhecida como síndrome clinicamente isolada (CIS, Clinically isolated syndrome, do inglês) com imagem de crânio compatível ao quadro de EM (AAN, 2017; MATUTE-BLANCH et al, 2018; ABN, 2018). Ademais, achados eventuais de lesões desmielinizantes isoladas na RMN em áreas sugestivas de EM, conhecido como síndrome

radiológica isolada (RIS, Radiologically isolated syndrome, do inglês) pode alertar os neurologistas quanto ao risco de fechar o diagnóstico de EM no futuro próximo.

Apesar de existirem diferentes curso clínicos, a grande maioria dos pacientes com EM (80 a 85%) é acometido pela forma recorrente remitente (EMRR), definida pela ocorrência de episódios agudos de comprometimento neurológico, com duração mínima de 24 (vinte e quatro) horas, e com um intervalo temporal ínfimo de 30 (trinta) dias entre cada recidiva (SCHUMACHER et al., 1965). Por razões ainda não conhecidas, cerca de 50% dos indivíduos com EMRR progride em 10 anos para a forma secundária progressiva (EMSP), caracteriza por neurodegenerativa irreversível (MAHAD, D. H., TRAPP, B. D., & LASSMANN, H. 2012). Em apenas 5% dos casos de EM, os pacientes apresentam um curso progressivo de velocidade variável logo após a primeira recidiva, sendo conhecida como EM primária progressiva (EMPP) (DECK et al., 2013).

Em 2009, a partir de informações sobre a frequência e gravidade das recidivas ao longo de 6 (seis) meses de acompanhamento, associada a presença ou não de incapacidade neurológica residual após remissão clínica (COMINI-FROTA, E. R; VASCONCELOS C.F.C; MENDES M.F, 2017), permitiu aos médicos identificarem os pacientes com EMRR com ausência (NEDA, do inglês no evidence of disease activity) ou mínima (MEDA, do inglês minimal evidence of disease activity) atividade da doença (GIOVANNONI, 2018; ABN, BCTRIMS, 2018).

O grau de comprometimento neurológico em pacientes é frequentemente avaliado por meio da escala expandida do estado de incapacidade (EDSS, do inglês Expanded Disability Status Scale) (KURTZE, 1983) (Figura 1), responsável por avaliar os sistemas funcionais (FS, do inglês functional systems). A escala possui 20 itens, contendo pontuações que variam de 0 (zero) a 10 (dez), aumentando meio ponto de acordo com o grau de incapacidade apresentado pelo paciente. Dentre as qualidades avaliadas, a análise possui como finalidade principal a investigação da capacidade de deambulação, em especial quando o EDSS é superior a 4 (quatro). Dessa forma, em seu sistema avaliativo, 0 (zero) indica um paciente sem déficit neurológico, em contrapartida

10 (dez) elucida a morte devido à EM, sendo esse um evento raro (GAFSON, A., GIOVANNONI, G., & HAWKES, C. H. 2012). Vale a pena salientar que a escala possui a sua avaliação voltada somente à deambulação, sendo assim, essa não é capaz e avaliar outras incapacidades, tais como cognição, fadiga e depressão (DARGAHI et al, 2017).

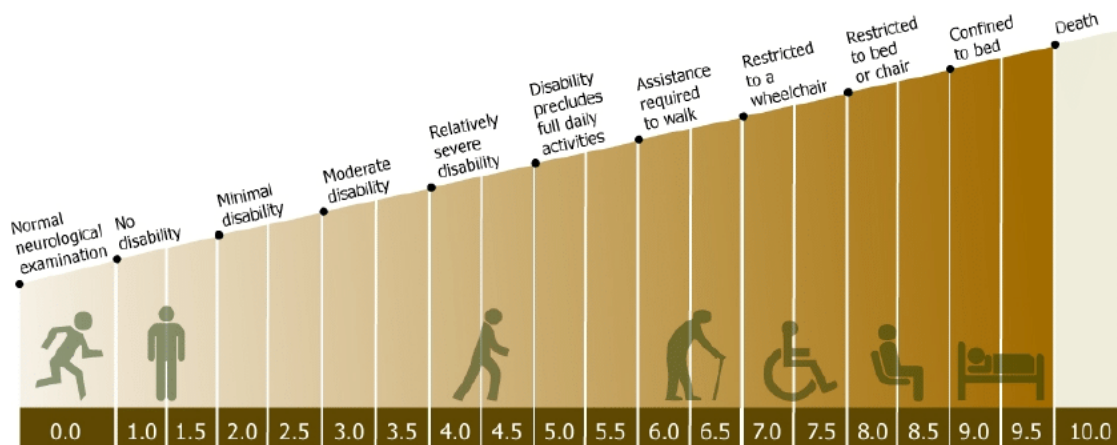


Figura 1. Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke. Método utilizado para medir o grau de incapacidade na EM. A escala categoriza a incapacidade em diferentes sistemas funcionais, permitindo aos neurologistas atribuir a pontuação específica. Fonte: International Journal of Molecular Sciences, adaptado de Buzzard, K.A., et al, 2012.

Um recente estudo brasileiro, realizado por Vasconcelos e colaboradores (2020), identificou um conjunto de fatores que podem acelerar a progressão para a forma secundária progressiva da EM (EMSP). Esses fatores incluem: início da doença após os 30 (trinta) anos, intervalo de até 2 (dois) anos entre a primeira e a segunda recaída, comprometimento piramidal e cerebelar durante a manifestação inicial da doença, ausência de tratamento antes do paciente atingir uma pontuação de 3 (três) no EDSS e ancestralidade africana. Com base nesses critérios, os pacientes podem ser classificados em alto e baixo risco de progressão, sendo considerados alto risco aqueles que se enquadram no mínimo em 3 (três) dessas categorias (VASCONCELOS et al. 2020).

Reconhecido como um distúrbio autoimune que acomete o SNC, classificado erroneamente como um subtipo grave da EM no decorrer do tempo, a neuromielite óptica (NMO) apresenta-se como uma doença responsável pela desmielinização dos nervos oculares assim como da medula espinhal,

pertencendo ao grupo de doenças denominado Transtorno do Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD) (ARGYRIOU; MARKIS, 2008; WINGERCHUK et al., 2015). A NMOSD ocorre classicamente por meio de 2 (duas) manifestações clínicas clássicas: Neurite Óptica (NO) e Mielite Transversa Aguda (MTA) (WINGERCHUK et al., 1999; WINGERCHUK et al., 2015), classicamente levando o paciente a amaurose, astenia, hipoestesia, intestino e bexiga neurogênicos (ROSALES; KISTER, 2016).

À semelhança da EM, a maioria dos casos de NMOSD (80 a 90%) evoluem com a forma RR, assim, exibindo recidivas por meio de crises agudas neurite óptica (NO), mielite transversa aguda (MTA), ou ambas, acompanhado de remissão, geralmente parcial (WINGERCHUCK; WEINSHENKER et al., 2017; PEREIRA et al., 2015). Em relação a epidemiologia, o NMOSD é considerado uma doença rara. Estima-se que a prevalência mundial esteja na faixa de 0,34 a 10 para adultos e 0,6 a 0,22 para crianças a cada 100.000 indivíduos (FLANAGAN et al., 2016; MIYAMOTO et al., 2018; BOESEN et al., 2018). De acordo com Papp e colaboradores (2021), a incidência ao redor do globo decorre por volta de 0,039 a 0,73 em adultos, enquanto em menores de 18 (dezoito) anos apresenta-se entre 0,01 e 0,06 a cada 100.000 indivíduos. De acordo com a literatura, o NMOSD é mais habitual em indivíduos não-caucasianos e em localidades com baixa prevalência de EM, acometendo mais indivíduos com uma idade média de 40 (quarenta) anos. Todavia, semelhantemente à EM, o NMOSD acomete mais o sexo feminino quando comparado ao masculino (razão de 9:1) (GOLD SM et al., 2019; KITLEY J et al., 2014; SATO DK et al., 2014; PAPAIS-ALVARENGA et al., 2015; COSSBURN et al., 2012; RIVERA et al., 2008; MEALY et al., 2012).

1.3. Imunopatogênese do NMOSD.

Diferentes da EM, NMOSD são condições autoimunes primariamente mediadas por autoanticorpos (FAN X, JIANG Y, HAN J et al., 2016; CHANG X, JIAO K, WANG D et al., 2023). Entretanto, a produção de anticorpos patogênicos anti-APQ4 (NMOSD) depende classicamente da colaboração entre as células B

com linfócitos T CD4⁺ foliculares (T_{FH}) (FAN et al., 2016; CHANG et al., 2023). A imunossinapse entre essas células envolve vários eventos cognitivos, tal com a apresentação de antígenos associados às moléculas do HLA de classe II. Nesse sentido, o diagnóstico de NMOSD tem sido associado à presença dos alelos HLA-DRβ1*04:05, *16:02 e 03:02 (ZAMVIL et al., 2015; KAMOI et al., 2019; MOLEY et al., 2024).

Reconhecida por seu papel central como principal canal transportador de água presentes no SNC, a AQP4 é expressa em níveis elevados dos pés dos astrócitos projetando-se para interface fluido-parênquima, sendo essa responsável pela homeostasia local (NIELSEN et al., 1997; RASH et al., 1998). Entretanto, a distribuição desses astrócitos é particularmente abundante nas regiões da medula espinhal, nervo óptico, tronco cerebral, regiões periventriculares, hipotálamo, área postrema e sob os núcleos supraóticos. Periféricamente, a AQP4 é expressa em células musculares esqueléticas, células parietais do estômago, pulmões, ductos coletores dos rins, ouvidos internos, glândulas salivares e retina. (WINGERCHUK et al., 2010; PAPADOPOULOS; VERKMAN AS, 2012; VERKMAN; ANDERSON; PAPADOPOULOS, 2014; WEISHENKER; WINGERCHUK, 2017). A ausência de comprometimentos multissistêmicos nos pacientes com NMOSD anti-AQP4⁺ tem sido explicada por duas hipóteses não excludentes, a expressão de diferentes isoformas da AQP4 no CNS e tecidos periféricos, e menor expressão de proteínas inibidoras da ativação do sistema complemento pela via clássica na região medular e nervo óptico (SAADOUN S; PAPADOPOULOS, 2015).

Apesar da NMOSD ser considerada uma astrocitopatia primária, agressivas lesões desmielinizantes com neurodegeneração parecem envolver a perda dos transportadores de glutamato EAAT2 (do inglês, excitatory aminoacid transporter-2) que são expressos justapostos aos complexos AQP-4 (SAADOUN et al., 2005; HINSON et al., 2008; NAGELHUS; OTTERSEN, 2013). A eficiente morte dos astrócitos deve-se também a outros dois aspectos moleculares, a produção de anticorpos anti-AQP4 do tipo IgG1, excelente subclasse de imunoglobulina na indução da ativação da via clássica (ISOBE et al., 2015), associada à elevada avidéz promovida pela formação do macrocomplexo ortogonal de AQP-4 isoforma M3, quando comparada a isoforma M1 encontrada

nos tecidos periféricos (HINSON et al., 2007; HINSON et al., 2012; WEINSHENKER; WINGERCHUK, 2017). Nesse sentido, enquanto a fixação do completo em células AQP-4 M1 induz rápida endocitose da proteína, persistente à deposição de fragmentos C3b (opsonina) e C5b-C9(n) (complexo de ataque à membrana), sobre os macroimunocomplexos IgG1/AQP4-M3 em astrócitos, esses parecem sobrepor a qualquer tentativa de regulação da cascata, se é que ocorre (JARIUS et al., 2008; JARIUS; WILDEMANN, 2010; PAPADOPOULOS; VERKMAN, 2012; WEINSHENKER; WINGERCHUK, 2014). Além do complemento, influxo de células imunes inatas, particularmente neutrófilos e eosinófilos amplificam o ataque as estruturas celulares da BHE e dos neurônios (MISU, TATSURO et al., 2013). Adicionalmente, com a diminuição de astrócitos viáveis, a capacidade do SNC de remover excesso de glutamato é prejudicada (ZENG et al., 2007; HINSON et al., 2008). Sabe-se que acúmulo desse neurotransmissor excitatório causa neurodegeneração (MCDONALD et al., 1998; PITT; WERNER; PAINE, 2000; SALTER; FERN, 2005). Portanto, a NMOSD é uma astrocitopatia responsável por promover uma desmielinização secundária (FUJIHARA et al., 2012).

Embora a presença do autoanticorpo anti-AQP4 apresenta-se como fator patognomônico no NMOSD, parte dos pacientes que fazem parte do espectro não possuem essa imunoglobulina circulante. Apesar de alguns autores acreditarem que outros autoanticorpos devem estar envolvidos na patogênese, cerca de 40% dos pacientes pertencentes ao NMOSD, negativos para anti-AQP4, apresentavam sorologia positiva para autoanticorpo anti-MOG (ROSENTHAL; HOFFMAN; TYOR, 2020), tendo sido, desde 2015, estabelecida como uma nossa entidade nosológica à parte da NMOSD.

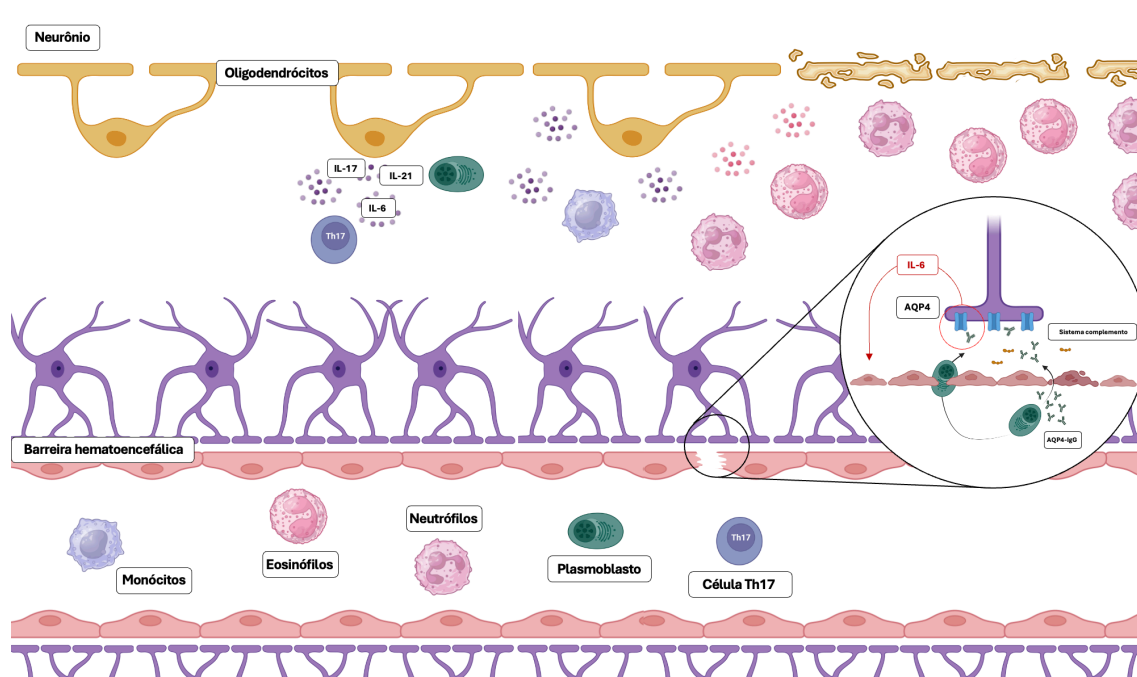


Figura 2. Visão geral da patogênese do NMOSD. A imagem apresentada ilustra, de forma esquemática, o mecanismo envolvido na imunopatogênese da Doença do Espectro da Neuromielite Óptica (NMOSD) em indivíduos soropositivos para autoanticorpos anti-AQP4. O processo patológico tem início com o reconhecimento dos canais de aquaporina-4 (AQP4), expressos nas extremidades dos pés dos astrócitos, como autoantígenos. Este reconhecimento leva à ativação de linfócitos B em plasmócitos secretores de imunoglobulinas da classe IgG1. Essas imunoglobulinas formam complexos imunes ortogonais de alta afinidade (AQP4-IgG1), resistentes aos mecanismos de regulação imunológica local. A ligação desses autoanticorpos aos canais AQP4 induz a ativação da via clássica do sistema complemento, promovendo a lise dos astrócitos e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). A destruição dessas células acarreta a liberação de mediadores inflamatórios, entre os quais destaca-se a interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória que contribui para o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Tal disfunção permite o recrutamento de leucócitos para o sistema nervoso central, amplificando a resposta inflamatória local. Esse processo culmina em uma astrocitopatia primária, que por sua vez desencadeia, de forma secundária, a desmielinização das fibras nervosas. Fonte: Autoria própria, 2024.

1.4. Imunopatogênese da Esclerose Múltipla.

Caracterizada como uma DAD mediada principalmente por subtipos de células T mielino-específicas, a presença de células B ativadas formando estruturas semelhantes a folículos linfoides localizados abaixo das meninges dos pacientes com EMRR parecer ser um dos grandes contribuintes da neurodegeneração.

1.4.1. Células Th1, Th17 e células B na Esclerose Múltipla.

A respeito dos genes participantes desse processo autoimune, os alelos pertencentes aos antígenos leucocitários humanos (HLA, do inglês human leukocyte antigens) DR15*1501, DRB5*0101, DQA1*0102 e DQB1*0602 localizados no cromossomo 6 são os mais associados ao risco de desenvolver EM (DYMENT, 2004). A apresentação dos peptídeos da mielina pelas células apresentadoras imunogênicas produtoras de IL-23 e IL-6, na ausência de fator beta de crescimento transformado (TGF- β , do inglês Transforming growth factor-beta), favorece a indução de diferentes subtipos de células Th17 patogênicas (ROR γ T⁺ T-bet⁺ IFN- γ ⁺) (BURKETT, P. R., MEYER ZU HORSTE, G., KUCHROO, V. K. et al., 2015), alguns deles implicados na EMRR (SUPPIEJ, A.; CAINELLI, E. 2014; WING et al. 2016). Dessa maneira, em 1999, Matusevicius e colaboradores demonstraram elevada produção IL-17 e IL-6 por células mononucleares do sangue periférico de pacientes com EM durante a recaída clínica. Aumento na frequência de células Th17 foi observado no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com EM durante os períodos de recidiva clínica (BRUCKLACHER-WALDERT et al. 2009) (Figura 3). Elevados níveis de transcritos de RNA mensageiros para IL-17 foram observados em lesões crônicas de pacientes (LOCK et al. 2002; LOVETT-RACKE et al. 2011; MATUSEVICIUS et al. 1999). A expansão de astrócitos neurotóxicos e na proporção de oligodendrócitos em apoptose nos locais de desmielinização foram relacionados ao aumento da expressão de IL-17 no SNC (LIDDELOW; BARRES, 2017). Ademais, sintetizada tanto pelo fenótipo Th17 quanto por células Th22, a IL-22 aumenta a sensibilidade dos oligodendrócitos à morte apoptótica pela via do Fas/FasL (VISEKRUNA; HUBER, 2014).

Além das células Th17, linfócitos Th1 parecem participar das lesões cerebrais na EM. Células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ foram encontradas tanto no sangue periférico quanto LCR dos pacientes em recidivas clínicas (TABARKIEWICZ et al., 2015). Grandes quantidades de IFN- γ também foram associadas à apoptose de oligodendrócitos (MITTRÜCKER, VISEKRUNA; HUBER, 2014).

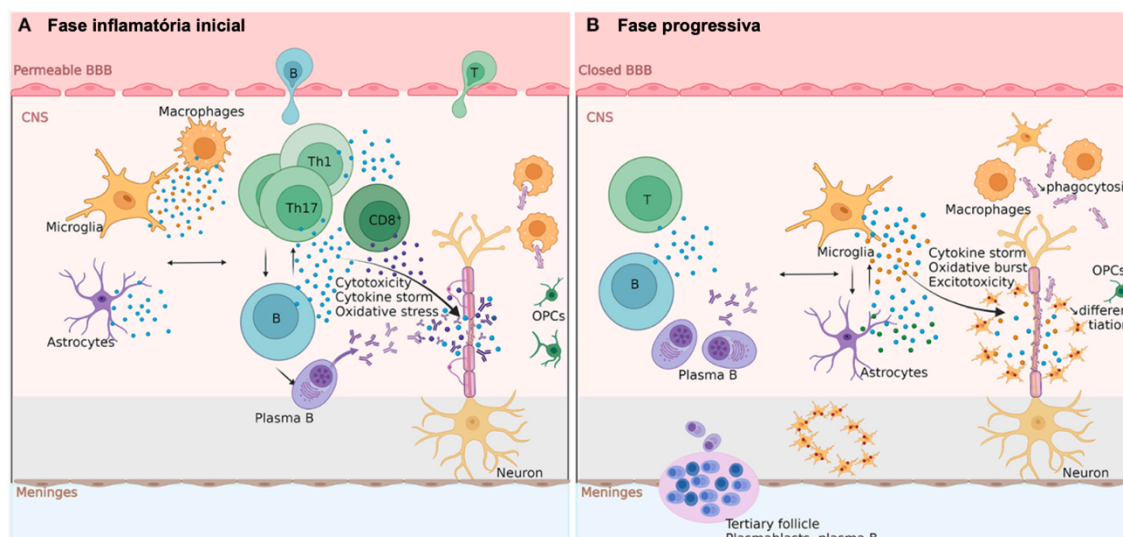


Figura 3. Fisiopatologia da Esclerose Múltipla e o papel das células Th17, T CD8⁺ e células B. (A): Secundária a barreira hematoencefálica injuriada, a fase inflamatória inicial possui sua fisiopatologia pautada no envolvimento de células autoimunológicas periféricas tais como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, células B, plasmócitos e macrófagos as quais adentram no parênquima do SNC secretando não só citocinas pró-inflamatórias (haja vista, IFN- γ e IL-17), autoanticorpos assim como moléculas citotóxicas (como por exemplo, granzimas B e espécies reativas de oxigênio). Como resultado, esse ambiente agora pró-inflamatório citotóxico é responsável por agredir a bainha de mielina localizada em volta dos axônios. (B): Na fase progressiva da doença, o infiltrado inflamatório ativo no parênquima é reduzido. As células imunes se organizam em compartimentos meníngeos e periventriculares, formando agregados linfoides, com predomínio de células B e microglia ativadas. Nessa fase, o dano ocorre de forma contínua e menos exuberante, sendo mediado por inflamação crônica de baixo grau, liberação sustentada de citocinas neurotóxicas e espécies reativas de oxigênio, além de disfunção mitocondrial e degeneração axonal progressiva, mesmo com BHE preservada. Fonte: *Frontiers in Neurology*, adaptado de Perdaens & Pesch, 2022.

Rasouli e colaboradores (2015) relatam uma relação estreita a presença de células Th1 e Th17 capazes de sintetizar GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, do inglês) no LCR com gravidade a atividade radiológica da doença, identificada pela presença de áreas captantes de gadolínio na RMN de crânio dos pacientes com EM. É provável a presença de células T capazes de produzir GM-CSF, por aumentar o recrutamento e ativação dos granulócitos e macrófagos, possuam um caráter mais encefalitogênico que os subtipos Th1 e Th17 incapazes de sintetizar esse fator hematopoiético (CODARRI et al., 2011; PONOMAREV et al., 2007; RASOULI et al., 2015).

As células T CD8⁺ citotóxicas também têm sido apontadas como importantes promotores da desmielinização na EMRR (DWYER et al. 2020). Finalmente, particularmente nos pacientes com EMSP, células B tem ganhado recentemente uma posição de destaque.

1.4.2. Os subtipos de linfócitos B circulantes e o seu papel na imunopatologia da Esclerose Múltipla.

As células B são universalmente identificadas pelo marcador de linhagem CD19 e, a maioria desses linfócitos no sangue periférico, é de origem da medula-óssea. Por meio de processos de seleção celular, tais células tornam-se habilitadas à transmigração para a periferia (ZEHENTMEIER, PEREIRA, 2019; BRANDSTADTER, MAILLARD, 2019). Em meio a diversidade celular, um percentual expressivo é reconhecido como células B-2, as quais expressam tanto IgM quanto IgD em sua superfície celular e são mais dependentes da interação com células T foliculares (T_{FH}) para elaborar respostas imunes humorais contra antígenos proteicos (BANIAHMAD et al. 2020). Dependendo da expressão diferencial de alguns marcadores, essas células B-2 podem ser, adicionalmente classificadas como sendo transicionais ($CD19^+IgM^+IgD^-CD38^{++}CD27^-$), naïve ($CD19^+IgM^+IgD^+CD38^+CD27^-$), subtipos de linfócitos de memória ($CD19^+IgD^-CD38^-CD27^-$; $CD19^+IgD^-CD38^+CD27^+$; $CD19^+IgD^-CD38^-CD27^+$) e plasmoblastos ($CD19^+CD38^{++}CD27^{++}$). Vale salientar que a expressão CD138 em plasmoblastos indica células mais funcionais e com maior habilidade de se tornarem plasmócitos, subtipo de células B que produz anticorpos. Ademais, intensidade de expressão do HLA-DR tem sido associado às células B mais imunogênicas (JENKS et al, 2018). Embora pouco abordado na literatura, a relação entre as citocinas produzidas por essas células e os seus efeitos na periferia pode auxiliar na compreensão da funcionalidade desses linfócitos e o seu papel na ativação e diferenciação das células T $CD4^+$ no decorrer da resposta imunológica.

No decorrer da formação das células B, o subtipo transicional é considerado o precursor de células B virgens que deixam a medula-óssea. Na periferia, e preferencialmente nos folículos linfoides secundários, células B-2 naïves podem ser ativadas na presença pelas células T $CD4^+$ foliculares se tornando células B de memória e/ou plasmoblastos. Enquanto os linfócitos B de memória são responsáveis por responder de imediato e de forma mais efetiva

um novo desafio com o mesmo estímulo antigênico, os plasmoblastos, particularmente o subtipo $CD138^+$, se transformam em plasmócitos, exercendo a sua clássica função, produzir anticorpos. Dentro do compartimento de células B de memória, subtipos $CD27^+$ indicam que esses linfócitos já sofreram troca de classe da imunoglobulina e hipermutações somáticas, fomentando respostas humorais específicas mais robustas quando comparadas às células de $CD19^+CD27^-$. Além de produzir anticorpos, em muitas respostas imunes, a função apresentadora de antígeno das células B imunogênicas, identificadas pela expressão de $CD80/CD86$ e de elevados níveis de $HLA-DR$, tem sido central tanto na proteção contra patógenos como na gravidade de doenças autoimunes (ORACKI et al. 2010; Kumar G, Axtell, 2023).

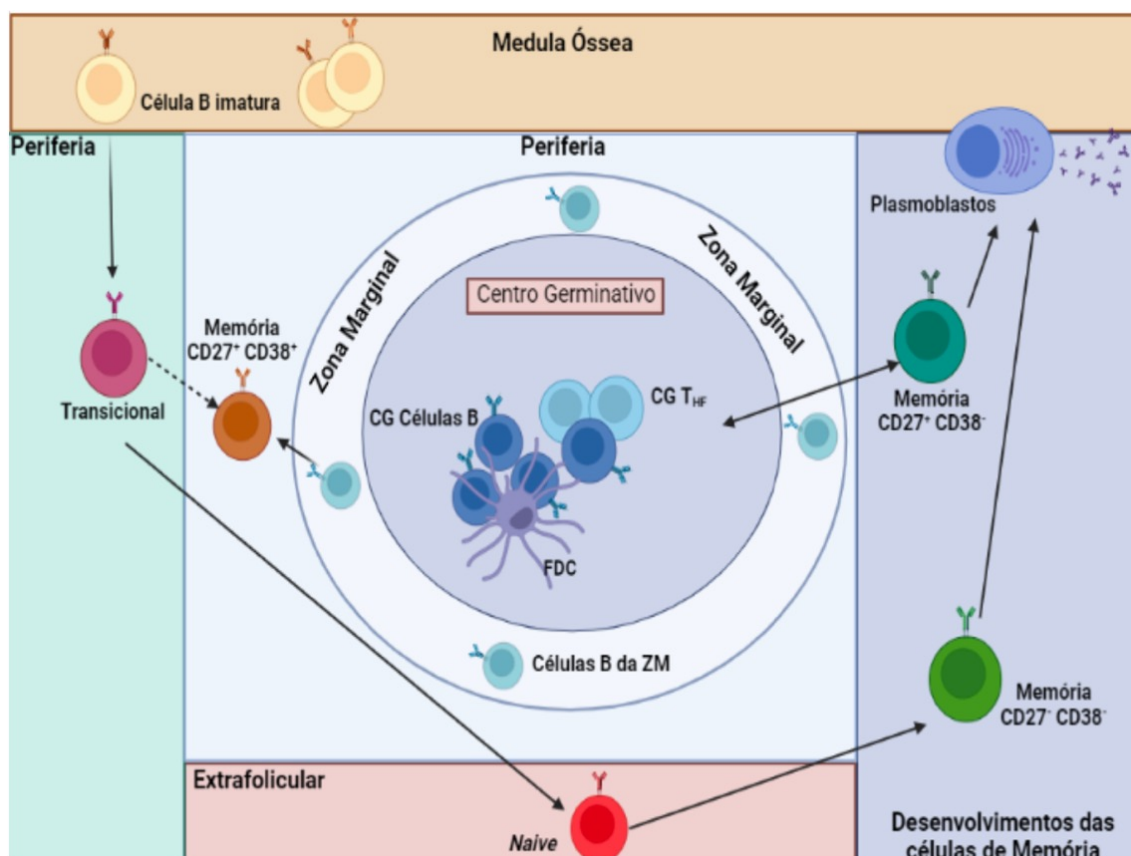


Figura 4. Maturação das células B humanas e seus marcadores superficiais. As células B imaturas localizadas inicialmente na medula óssea migram para a periferia, assim, sendo denominadas nesse momento de células B transicionais. A partir disso, tais células localizadas na periferia migram em direção à região extrafolicular, diferenciando-se em *naive*. Por fim, essas se transformam em células de memória que darão origem aos plasmoblastos. (→) sinaliza a presença de literatura evidenciando tal processo, em contrapartida (—→) elucida associações teóricas. Centro germinativo (GC, do inglês *germinative center*); célula dendrítica folicular (FDC, do inglês *follicular dendritic cell*). Fonte: *Frontiers in Immunology*, adaptado de Sanz e colaboradores, 2019.

O achado patognomônico de bancas oligoclonais de autoanticorpos IgG no LCR dos pacientes com EM, evidenciam a existência de células B no processo imunopatológico da doença (DISANTO, G. et al. 2012; MIYAZAKI, Y et al. 2014; PIANCONE et al 2016; JONES et al, 2016; LI; BAR-OR, 2018; COMI et al, 2021). O benefício da imunoterapia com anticorpos monoclonais anti-CD20, haja vista Rituximabe e Ocrelizumabe, na EM tem sido associada à eliminação de células B de memória produtoras de linfotóxina- α (LT- α), fator α de necrose tumoral (TNF- α), IL-6 e GM-CSF (Li *et al.*, 2015).

Em pacientes com EM, atividade da doença tem sido associada à presença de linfócitos B CD20⁺ nas meninges, formando estruturas semelhantes à folículos linfoides ectópicos (eFLs). Essas estruturas foram diretamente correlacionadas ao número e tamanho das lesões corticais, assim como a liberação de neurofilamento de cadeia leve (NFL) no LCR, um marcador de neurodegeneração neuronais associadas à inflamação (MAGLIOZZI et al, 2018/2019; CENCIONI et al. 2021). Esses resultados apontam para o papel patogênico das células B na EM.

Entretanto, à semelhança das células T CD4⁺, linfócitos B apresentam plasticidade funcional, e alguns estudos também em EMRR tem demonstrado o papel protetor de células B reguladoras no curso da doença (KUMAR G, AXTELL, 2023).

1.5. Tratamento da Esclerose Múltipla, NMOSD e MOGAD.

Embora a EM não possua medicamentos que promovam a cura propriamente dita, a terapêutica atual relacionada a essa doença encontra-se voltada para 2 (duas) diferentes abordagens, beneficiando em especial pacientes acometidos com a EMRR, a citar: controle das recaídas clínicas agudas vigentes e da recorrência destas. Na fase aguda, a pulsoterapia com elevadas doses intravenosas de metilprednisona é o protocolo universal de resgate desses pacientes. O manejo terapêutico da segunda fase, iniciada na fase de remissão completa ou parcial do surto, é feito à base de terapias modificadores de doença (TMD) (DARGAHI et al., 2017; BCTRIMS, 2018).

Alguns fármacos e imunobiológicos estão disponíveis para o tratamento da EM e todos objetivam mitigar novos episódios de atividades clínicas e radiológicas, assim, moderando tanto o risco quanto a gravidade das recaídas (SCOLDING et al., 2015). Embora determinados autores abordem que o tratamento terapêutico quando efetuado na síndrome clínica isolada (CIS) possui a capacidade de reduzir o risco de evolução para fenótipos mais agressivos (PAOLICELLI et al., 2020), até o presente momento, no Brasil, a intervenção medicamentosa ocorre depois do diagnóstico definitivo de EMRR.

Apesar da decisão terapêutica levar em considerações alguns aspectos do paciente (COMINI-FROTA et al., 2017), o escalonamento terapêutico segue o Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas (PCDT) preconizado pelo Ministério da Saúde (BCTRIMS, 2018). Nesse sentido, as opções de TDM de primeira linha no tratamento da EM são IFN- β e dimetilfumarato (DMF), acetato de galatirâmer, teriflunomida e cladribina. Em casos descritos de pacientes acometidos com a alta atividade clínica da EMRR, ou falha terapêutica a TDM de primeira linha, fármacos como alentuzumabe, cladribina, fingolimóides (FGL), natalizumabe ou ocrelizumabe são prescritos como terapias de resgate. Embora os seguintes métodos terapêuticos não tenham sido validados pela ANVISA, o transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas, mitoxantrona, ciclofosfamida e o rituximabe podem ser empregados como parte do tratamento (COMINI-FROTA et al., 2017; BCTRIMS, 2018).

Fatores como falha terapêutica e o aparecimento de efeitos adversos graves são norteadores em decisões que visam tanto a troca do medicamento utilizado quanto ajuste posológico da intervenção medicamentosa. Dessa maneira, falha terapêutica é definida por alguns critérios, a citar: ocorrência de 2 (dois) ou mais recidivas em um intervalo temporal de 12 (doze) meses, podendo essa deter um caráter moderado ou grave - possuindo sequelas ou limitações significantes insuficientemente responsivas à pulsoterapia; e aumento de 1 (um) ponto na escala EDSS, ou progressão de lesões ativas captantes de gadolínio (DARGAHI et al., 2017).

Quando comparada à EM, pacientes acometidos com NMOSD obtém um tratamento com menor arsenal terapêutico. Semelhante à EM, manejo das

recidivas também é conduzido pela pulsoterapia com metilprednisona (KIMBROUGH et al., 2012; TREBST et al., 2014; SAHRAIAN et al., 2017; SELLNER et al., 2010). Caso a pulsoterapia não promovam o efeito benéfico esperado, o paciente é submetido a plasmaferese como manobra para remoção de anticorpos, citocinas pró-inflamatórias e componentes do sistema complemento presentes no sangue (REEVES; WINTERS, 2014; YOSHIDA et al., 2010). De caráter mais agressiva que a EM, entre as recaídas, o manejo da NMOSD é feito a longo-prazo com drogas imunossupressoras, tendo como primeira linha de tratamento do espectro o Micofenolato de Mofetila (MM) e a Azatioprina (AZA) (HUDA S et al., 2019). Ademais, doses adicionais orais de prednisolona ofertadas durante o tratamento de manutenção apontam um efeito mais protetor quando comparada ao uso isolado de MM ou AZA (PALACE J et al., 2012). Quando o paciente apresenta falhas a esta primeira linha de tratamento, imunobiológicos à base de anticorpos monoclonais apresentam-se como importantes agentes na prevenção de recaídas. Os monoclonais rituximabe, ocrelizumabe, ofatumumabe, ublituximabe são integrantes dessa classe medicamentosa atuantes na depleção de células B CD20⁺ circulantes por meio da citotoxicidade dependente de complemento e citotoxicidade dependente de anticorpos (LEVY; MEALY; 2021; JACOB et al., 2008). Atualmente, a FDA autorizou a utilização do inebilizumabe cujo alvo celular são linfócitos B CD19⁺ (CHEN et al., 2016; NIE; BLAIR, 2022), possibilitando a depleção de um espectro maior de subtipos de células B, incluindo plasmócitos. Até este momento, nenhum medicamento voltado para MOGAD em específico foi apontado na literatura, onde pacientes acometidos com tal condição compartilham de estratégias terapêuticas com os indivíduos pertencentes à NMOSD.

Além de fatores genéticos, eventos ambientais podem aumentar o risco de desenvolvimento, gravidade e sucesso terapêutico de EM e NMOSD, tal como a disbiose intestinal.

1.6. Eixo cérebro-intestino e o sistema imunológico.

Apresentando-se como um ambiente externo ao corpo humano, o trato gastrointestinal é reconhecido não só por sua função de absorção de nutrientes, mas também por sua diversa microbiota cujo mutualismo entre essa e o hospedeiro é responsável pela manutenção da vida. Entretanto, uma vez que tais organismos são estranhos ao corpo humano, barreiras físico-químicas por meio da produção de muco por meio das células caliciformes, junções comunicantes epiteliais e peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês, antimicrobial peptides) são necessárias a fim de manter a homeostase (VANCAMELBEKE M; VERMEIRE S, 2017). O tecido linfoide associado ao intestino (GALT, do inglês, gut-associated lymphoid tissue) por meio desses mecanismos é responsável pela promoção da defesa do organismo contra microrganismos intrínsecos e extrínsecos no trato gastrointestinal (MÖRBE et al., 2021). Receptores de reconhecimento de padrão (PRRs, do inglês, pattern recognition receptors) viabilizam a identificação via sistema imunológico inato, capaz de identificar microrganismos considerados nocivos, mediante a presença de padrões moleculares associados aos microrganismos (MAMPs, do inglês, microorganism-associated molecular patterns) e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns, do inglês) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010; WANG HX; WANG YP, 2016). Todos esses mecanismos celulares são responsáveis por restringir uma interação entre o epitélio gastrointestinal e a microbiota, todavia essa é responsável por atuar de forma limitada sob o epitélio e o sistema imunológico presente (HOOPER LV et al., 2012).

1.7. Disbiose, desregulação imune e as doenças autoimunes desmielinizantes do SNC: breve descrição.

Em estado de equilíbrio do ecossistema intestinal, definida como eubiose, a composição entre microrganismos comensais e patogênicos cria um ambiente de homeostase imune que impactam positivamente na qualidade da resposta imune do indivíduo perante a potenciais ameaças externas, os patógenos, e internas, as reações de hipersensibilidades (IEBBA et al., 2016). Esse equilíbrio

na composição da microbiota intestinal é fundamental para integridade física, química e imunológica. Quando em estado de homeostase, diferentes subtipos de células epiteliais da mucosa mantêm a produção de muco e peptídeos antimicrobianos, além da expressão ativa de receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês pathogen-associated molecular pattern) e ao dano (DAMPs, do inglês damage-associated molecular pattern) (HOOPER LV et al., 2012; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; WANG HX; WANG YP, 2016), permitindo a essas células de mucosa acessarem produtos microbianos que induzirão uma resposta imune local cujo desfecho desejável, em eubiose, é a exclusão de eventuais microrganismos que conseguem transmigration via mucosa (VANCAMELBEKE M; VERMEIRE S, 2017).. Para maior sucesso, e com o auxílio do próprio epitélio, a superfície luminal das mucosas contam com a importante ajuda dos anticorpos IgA.

A capacidade do tecido linfóide associado a mucosa de produzir níveis satisfatórios de IgA indica, indiretamente, estado de eubiose desde que a produção desses anticorpos da capacidade das células B interagirem com células T_{FH}17 não patogênicas em um ambiente imune equilibrado de tolerância imunológica garantido pela presença de células T CD4⁺ reguladoras (LATHROP et al., 2011). De forma interessante, a indução de células T reguladoras, por sua vez, depende da produção da citocina TGF- β (do inglês, transforming growth factor β) pelas células epiteliais do intestino, assim como da produção de IL-10 por células dendríticas CD103⁺ da lâmina própria estimuladas com metabólitos produzidos pela microbiota intestinal, particularmente os ácidos graxos de cadeias curtas (SCFAs, do inglês, short-chain fatty acids) (SILVA et al., 2020). e produtos da metabolização da vitamina A, o ácido retinóico (AR) (SIDDIQUI; POWRIE, 2008; MORO-SIBILOT et al., 2016; LUU et al., 2017; PATHAK et al., 2020). A presença desses receptores para SCFA e RA nas células T indicam que esses metabólitos também devem favorecer diretamente expansão de fenótipos reguladores (Liu et al., 2015; van der Hee e Wells, 2021). Mudanças na composição microbiana original com favorecimento de bactérias patobiontes dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* têm sido amplamente associadas à disbiose intestinal (AHLAWAT et al., 2021; DUBINSKI et al., 2021). Por favorecer a expansão de fenótipos efetores de células T, particularmente Th1 e Th17 em

detrimento a danos funcionais nas células reguladoras intestinais (RAHMAN; DANDEKAR, 2021; SCHÄCHTLE; ROSSHART, 2021), o alcance dos impactos negativos dessas alterações pode alterar a relação dinâmica entre intestino e cérebro, visto que existe um trânsito diário de células T intestinais em direção ao SNC.

A disbiose intestinal tem sido associada à EM (ORDOÑEZ-RODRIGUEZ et al., 2023) e a NMOSD (SHI et al., 2019). Nesse sentido, estudos publicados pelo nosso grupo demonstrou uma relação estreita entre aumento na frequência de células T circulantes que expressam receptores do tipo toll (TLR, do inglês toll-like receptors)-2 e TLR-4 com gravidade da EMRR (FERREIRA et al., 2018) e NMOSD (DIAS et al., 2019). De forma interessante, essas células, quando ativadas via TLR-2 e TLR-4, produzem IL-17, IL-6 e IFN- γ . Mais importante, a presença dessas células foi diretamente correlacionada a gravidade das incapacidades neurológicas (FERREIRA et al., 2018; DIAS et al., 2019), e, mais recentemente, a maior risco de falha terapêutica (HYGINO et al., 2024).

Interessantemente, um estudo publicado por Kadowaki e colaboradores (2019), demonstrou que, quando comparado a indivíduos saudáveis, a frequência de células T CD4⁺ expressando o receptor de endereçamento de mucosa intestinal, o CCR9, foi elevada em pacientes com EMPS. Em indivíduos saudáveis, células T CCR9⁺ expressam elevados níveis de receptor de endereçamento para o SNC, o CCR6, porém exibiram um fenótipo regulador (IL-10⁺). Entretanto, em pacientes com EMSP, estas células T CCR9⁺CCR6⁺ expressam marcadores de células Th17 patogênicas, identificada pela elevada produção de IL-17 e IFN- γ . Classicamente, células T circulantes oriundas do intestino não apenas expressão CCR9, como também a integrina $\alpha_4\beta_7$ que se liga a molécula de adesão vascular MADCAM1 (do inglês mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1). No modelo experimental da EM, conhecido como encefalomielite autoimune experimental, anticorpos monoclonais neutralização anti-MADCAM1 reduziram a gravidade da doença no animal. Ainda, estudos em pacientes com EMRR, a disbiose intestinal também foi associada a elevada frequência de células T CD4⁺ e TCD8⁺ CXCR3^{hi} $\alpha_4\beta_7$ ⁺ IFN- γ ⁺ (CHOILEÁIN et al., 2019).

Levando-se em consideração que células B têm sido associadas à NMOSD e a formas graves da EM, estudos sobre a expressão do CCR9 e $\alpha_4\beta_7$ nestas DAD estão faltando.

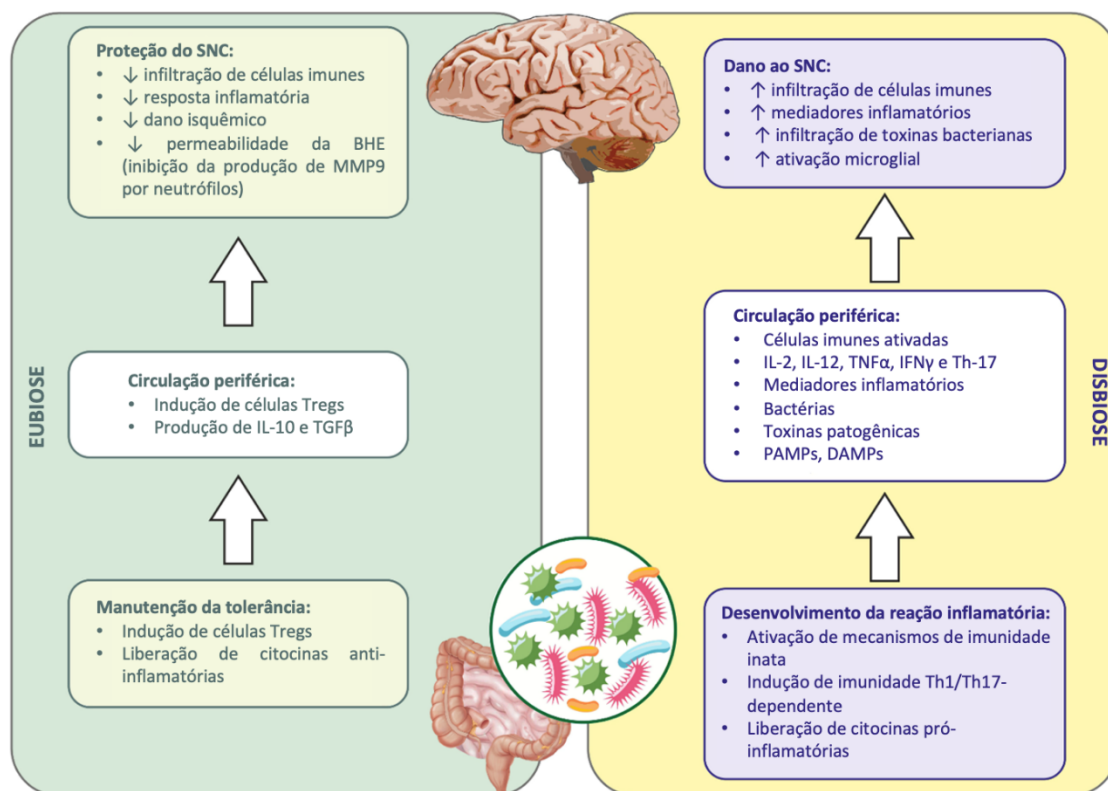


Figura 5. Sinalização entre o sistema imunológico e sistema nervoso central em um contexto de eubiose e disbiose. A figura demonstra o impacto da composição da microbiota intestinal sobre a homeostase imunológica e a inflamação no sistema nervoso central (SNC). Em condições de eubiose, há indução de células T regulatórias (Tregs) e liberação de citocinas anti-inflamatórias (como IL-10 e TGF- β), que promovem tolerância imunológica periférica e reduzem a infiltração de células imunes no SNC, protegendo a barreira hematoencefálica (BHE) e limitando o dano inflamatório. Em contraste, em estados de disbiose, observa-se ativação exacerbada do sistema imune inato e indução de respostas Th1/Th17, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-12, TNF- α , IFN- γ), entrada de toxinas bacterianas e ativação microglial. Esse processo favorece a inflamação crônica e lesões no SNC, contribuindo para o desenvolvimento ou agravamento de doenças neuroinflamatórias. Barreira hematoencefálica (BBB, *blood-brain barrier*); Sistema nervoso central (SNC); DAMPs, padrões moleculares associados a danos; IFN γ , interferon gama; IL-2, interleucina-2; IL-10, interleucina-10; IL-12, interleucina-12; MMP9, metalopeptidase da matriz 9; PAMPs, Padrões moleculares associados a patógenos; TGF- β , fator de crescimento transformador β ; Th-1, células T helper 1; Th-17, células T helper 17; TNF α , fator de necrose tumoral α ; Tregs, células T reguladoras. Fonte: *Frontiers in Microbiology*, adaptado de Kasarello K, Cudnoch-Jedrzejewska A, Czarzasta K, 2023.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais.

Determinar a frequência de diferentes subtipos de células B circulantes em pacientes acometidos com EM e NMOSD, correlacionando com o grau de incapacidade neurológica e marcadores de translocação microbiana.

2.2. Objetivos específicos.

- ⇒ Obter amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis, pacientes com EM e NMOSD após a obtenção do consentimento oral e por escrito.
- ⇒ Determinar a porcentagem de diferentes subtipos de células B (virgens, ativados, memória, plasmoblastos) no sangue periférico.
- ⇒ Quantificar os níveis plasmáticos de LBP em indivíduos saudáveis, pacientes com EM e NMOSD e correlacionar com os fenótipos adquiridos via citometria de fluxo.
- ⇒ Correlacionar os achados imunológicos com a gravidade das incapacidades neurológicas.

3. METODOLOGIA

3.1. Pacientes.

Para o presente estudo 21 (vinte e um) pacientes diagnosticados com EMRR em fase de remissão clínica, 4 (quatro) pacientes soropositivos para IgG anti-AQP4 e 17 (dezessete) pacientes soronegativos para IgG anti-AQP4 pertencentes ao grupo NMOSD foram recrutados do serviço de Neurologia do Hospital Federal da Lagoa (HFL) e do Hospital Gaffrée e Guinle (HUGG, UNIRIO) entre o período de Agosto de 2023 a Julho de 2025. Como critério de exclusão, foram selecionados pacientes que não apresentavam quaisquer outras doenças autoimunes e neoplásicas, gestantes, tabagistas ou usuários de substâncias ilícitas. Em relação aos parâmetros clínicos, informações gerais sobre os pacientes como tratamento, idade, gênero, tempo de doença e grau de incapacidade neurológica foram obtidas por meio dos prontuários clínicos. Dos pacientes com EMRR, 18 (dezoito) recorriam ao uso da terapia modificadora da doença (TMD), enquanto 13 (treze) indivíduos com NMOSD se encontravam sobre tratamento com fármacos imunossupressores no momento da coleta. A maior parte dos pacientes presentes no atual estudo pertencem ao gênero feminino, os quais foram pareados de acordo com a idade. O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HUGG/UNIRIO (CAAE: 43009015.6.0000.5258). As amostras sanguíneas só foram coletadas após o consentimento oral e escrito de cada participante por meio da assinatura desses no termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2. Obtenção do plasma e células mononucleares do sangue periférico.

Aproximadamente 18 mL de sangue periférico de cada indivíduo participante do estudo foram coletados por meio de agulhas e tubos estéreis contendo heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NY). Após a flebotomia, a amostra biológica foi conduzida ao Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos Linfócitos T (LILiT, UNIRIO). A partir do sangue total,

alíquotas de plasmas foram obtidas para ensaios futuros de ELISA revestido de proteína de ligação LPS (LBP) (ThermoFisher, EUA), posteriormente, o sangue foi submetido a centrifugação a 2.000 rpm durante 20 (vinte) minutos em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Merck, EUA). A partir disso, as células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram coletadas, lavadas duas vezes com solução de Hank (ThermoFisher, EUA) e submetidas à determinação da viabilidade celular mediante a uma alíquota de azul de Trypan com parte das CMSP, utilizando para tal fim a Câmara de Neubauer. A concentração de CMSP viável utilizada para os experimentos funcionais foi de 2×10^6 células/mL. As células foram cultivadas em placas de 24 (vinte e quatro) poços de fundo chato em meio RPMI completo e ativadas durante 4 (quatro) horas com Phorbol-12-Miristato-13-Acetato [PMA (20ng/mL)] e Ionomicina [IO (600 ng/mL)] na presença de Brefeldina A (10 μ g/mL). Algumas culturas de células não foram estimuladas (controle negativo). Todas as culturas celulares foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂.

3.3. Análise por citometria de fluxo.

Para determinação da frequência de diferentes subtipos de linfócitos B, as células foram analisadas por meio do citômetro Attune NxT (ThermoFisher scientific, Life Technologies) e marcadas com anticorpos monoclonais direcionados contra diferentes marcadores de células B humanas (anti-CD19-Super Bright 600; anti-IgD-PerCP-eFluor 710; anti-CD38-PE; anti-CD27-Alexa Fluor 700; anti-HLA-DR-APC-eFluor780; anti-IL-17-APC, anti-IL-10-AlexaFluor 488, anti-CD138-PECy-7, anti- β 7-FITC; anti-CCR9-EF660). Em diferentes combinações, foi possível determinar os seguintes fenótipos de linfócitos B: Naïve (CD19⁺CD38⁺CD27⁻), Transicionais (CD19⁺CD38⁺⁺CD27⁻), Memória (CD19⁺CD38⁻CD27⁻; CD19⁺CD38⁻CD27⁺; CD19⁺CD38⁺CD27⁺) e Plasmoblastos (CD19⁺CD38⁺⁺CD27⁺⁺). Em todos esses subtipos, frequências de IgD, HLA-DR, integrina $\alpha_4\beta_7$, produção de citocinas IL-10 e IL17 e, exclusivamente em plasmoblastos, a frequência de CD138 foram avaliadas.

Quadro 1. Anticorpos utilizados para a marcação e identificação de linfócitos B, assim como suas subpopulações, derivados do sangue periférico.

	Fluorocromo	Clone
CD19	Super Bright 600	SJ25C1
CD38	PE-eFluor 610	HIT2
CD27	Alexa Fluor 700	0323
CD138 (Sydecan-1)	PE-Cyanine 7	DL-101
Integrina beta 7	FITC	FIB504
CD199 (CCR9)	eFluor 660	BBC3M4
HLA-DR	APC-eFluor 780	LM3
IgD	PerCP-eFluor 710	IA6-2
IL-10	eFluor 450	JES3-907
IL-17	PE-eFluor 610	eBio64DEC17

3.4. Técnica Cell-based assay (CBA).

Para a adequada classificação dos indivíduos com diagnóstico de neuromielite óptica espectro de doenças (NMOSD), é essencial a pesquisa dos autoanticorpos anti-aquaporina-4 (AQP4-IgG), uma vez que sua presença define uma importante subcategoria da doença, com implicações clínicas, imunopatológicas e terapêuticas distintas. Considerando a sensibilidade e especificidade superiores em comparação a outras técnicas sorológicas, a metodologia adotada para a detecção dos autoanticorpos foi o Cell-Based Assay (CBA), padrão-ouro atual para a identificação de AQP4-IgG. Brevemente, células HEK 293T foram cultivadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ em frascos de cultura T75 até atingirem aproximadamente 70 – 80% de confluência, momento o qual foram submetidas ao processo de transfecção plasmidial conforme as instruções do kit Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (ThermoFisher, EUA). Em relação aos testes, estes ocorreram somente quando observado uma taxa de transfecção superior à 20% por meio da técnica de citometria de fluxo. Após a confirmação da taxa mínima de células HEK 293T transfectadas, estas foram suspensas, lavadas e incubadas com os plasmas dos pacientes previamente diluídos em PBS 1x contendo 8% de soro normal de cabra (NGS, do inglês Normal Goat Serum), em placa de 96 poços. Em sequência, ocorreu a marcação da IgG humana, fixação com PFA (1%), etapas de lavagens e a marcação com anticorpo secundário, por fim, analisando posteriormente os resultados via citometria de fluxo.

3.5. Quantificação de LBP por ELISA tipo sanduíche.

Os níveis de proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LBP) humanos foram quantificados por meio de kits comerciais de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) Thermo Scientific Human LBP, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante (Thermo Fischer - Waltham, Massachusetts, USA). De forma breve, 100 μ L de plasma foram diluídas conforme recomendação do protocolo (1:1000) e adicionadas a cada poço previamente sensibilizado com anticorpo de captura específico para as respectivas proteínas. As placas foram incubadas por 2,5 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas. Posteriormente, 100 μ L do anticorpos de detecção biotinilados (anti-LBP) foram adicionados aos poços e incubados por mais 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação suave. Após nova etapa de lavagem, foi adicionada estreptavidina conjugada à enzima horseradish peroxidase (streptavidina-HRP) e incubada por 45 minutos conforme as especificações de ambos os kits. Em seguida, concluída a nova etapa de lavagem, 100 μ L do substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) foram aplicados ao abrigo da luz, e a reação foi revelada após 30 minutos com a adição de uma solução de parada. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 450 nm. Para cada kit, foi construída uma curva padrão a partir dos padrões liofilizados fornecidos pelo fabricante, com concentrações variando de 0,819 a 200 ng/mL (LBP), a fim de determinar os níveis das proteínas-alvo nas amostras analisadas.

3.6. Análise estatística.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa de gráfico GraphPad Prisma versão 8.0 para Windows (GraphPad). A fim de determinar se os dados seguiam ou não uma distribuição gaussiana, utilizou-se o Teste de Aderência de Kolmogorov-Smirnov. Ao apresentarem uma distribuição não normal, utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e correlação de Pearson. O teste t de Student, ou ANOVA e

correlação de Spearman foram aplicados para verificar se uma determinada variável, com distribuição normal, era estatisticamente diferente entre os indivíduos do mesmo grupo. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Características da população estudada.

Para o presente estudo, amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (n=10), com EM (n=21) e pertencentes ao NMOSD (n=21) foram colhidas e submetidas à avaliação da frequência de diferentes subtipos de células B. A população feminina se apresenta dominante no estudo onde a prevalência tanto na EM quanto no NMOSD é de 76,19% e 85,71%, respectivamente. Pacientes pertencentes ao grupo EM apresentaram o tratamento baseado, principalmente, em três fármacos: dimetil fumarato (19,05%), natalizumabe (28,57%) e fingolimoide (4,76%). Por outro lado, 38,10% dos pacientes com NMOSD recrutados não faziam uso de medicamentos no momento da coleta, enquanto o restante apresentou o uso da TMD baseada no uso de azatioprina (42,86%), micofenolato de mofetila (4,76%), fingolimoide (4,76%), gabapentina (4,76%) e carbamazepina (4,76%).

Tabela 1. Características da população estudada.

	Controle^a	EM^b	NMOSD^c
Nº de indivíduos (n)	10	21	21
Mulheres/homens (n)	7/3	16/5	18/3
Idade [(anos) média ± dp]^d	40,9 ± 5,96	41,67 ± 10,41	46,1 ± 12,85
Anti-AQP4^e			
<i>Testados/positivos (n)</i>	NA	21/0	21/4
EDSS [média (range)]^f	NA	2.24 (0-6)	4.6 (0-6.5)
TMD^g			
<i>Sem tratamento</i>	NA	3	8
	NA		9
<i>Azatioprina</i>		0	
<i>Micofenolato de mofetila</i>	NA	0	1
<i>Dimetil fumarato</i>	NA	4	0

<i>Natalizumabe</i>	NA	6	0
<i>Teriflunomida</i>	NA	1	0
<i>β-interferona 1a</i>	NA	1	0
<i>Acetato de Glatirâmer</i>	NA	2	0
<i>Fingolimoide</i>	NA	4	1
<i>Gabapentina</i>	NA	0	1
<i>Carbamazepina</i>	NA	0	1

Dados de ^aindivíduos saudáveis (controle) e de pacientes com esclerose múltipla (EM)^b e com doenças do complexo da neuromielite óptica (NMOSD)^c, todos em fase de remissão clínica. ^dIdade (anos) refere-se à idade em que as amostras de sangue foram coletadas. ^eDosagem de anticorpos anti-AQP4 pela técnica CBA (todos foram anti-MOG negativos). ^fEDSS. Escala Expandida de Status de Incapacidade. Esquema ^gTMD em uso no momento da coleta de sangue.

4.2. Avaliação fenotípica dos subtipos de células B circulantes de pacientes acometidos com EM e NMOSD.

Levando-se em conta o papel dual das células B em doenças autoimunes, como na EM (KUMAR G, AXTELL, 2023), o primeiro objetivo foi avaliar a frequência de diferentes células B circulantes em indivíduos saudáveis (controle) e pacientes com EM e NMOSD de acordo com a expressão diferencial de CD27 e CD38 dentre as células B totais (CD19⁺), utilizando para tal fim as estratégias de confinamento elucidadas na figura 6A, permitindo a identificação dos subtipos transicionais (CD27⁻CD38⁺⁺), *naïves* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblastos totais (CD27⁺⁺CD38⁺⁺) e plasmoblastos mais funcionais (CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) (MCCARON *et al.*, 2017), além de diferentes subtipos de células B de memória (CD19⁺CD27⁺CD38⁺; CD19⁺CD27⁺CD38⁻; CD19⁺CD27⁻CD38⁻) (Fig. 6A). Como observado na figura, a porcentagem de células B transicionais (Fig. 6C) e plasmablastos (totais e CD138⁺) (Fig. 6E) foi significativamente maior nos pacientes com EM e NMOSD quando comparado aos indivíduos controle, mas sem nenhuma diferença entre os dois grupos clínicos. Em relação aos diferentes subtipos de células B de memória (Fig. 6F), a proporção do subtipo CD27⁻CD38⁻ foi superior no grupo controle quando comparado apenas aos pacientes acometidos com EM. Análises estatísticas entre os dois grupos de pacientes não

revelou nenhuma diferença observada na frequência de subtipos de células B analisados no presente estudo (Fig. 6).

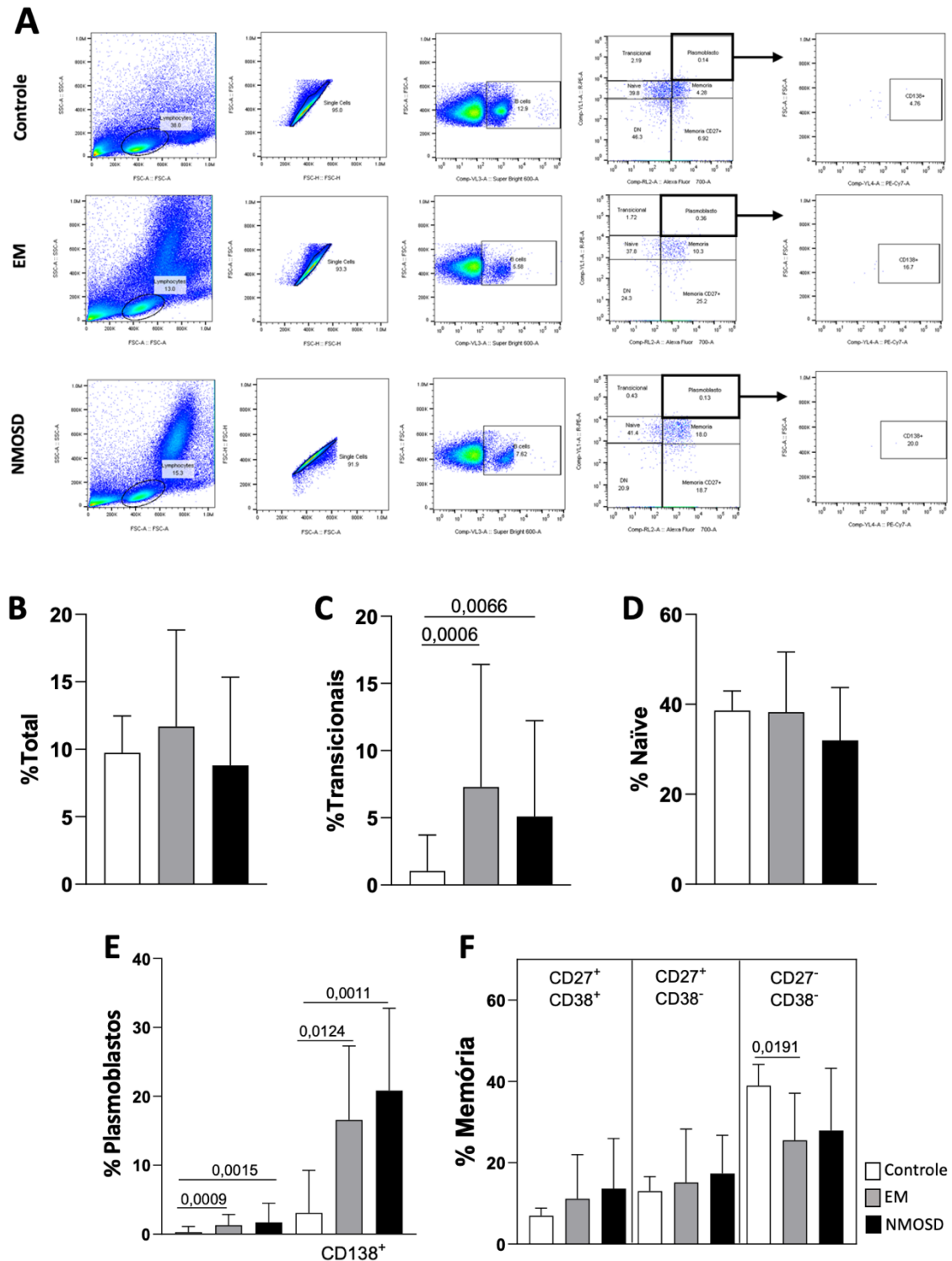
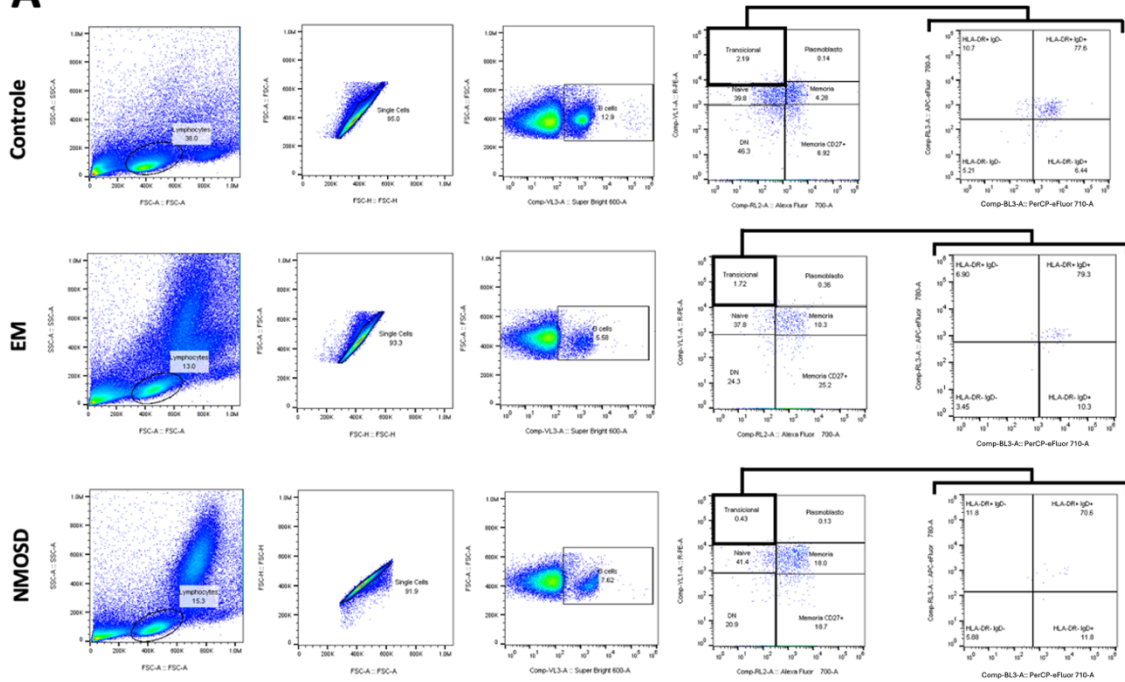
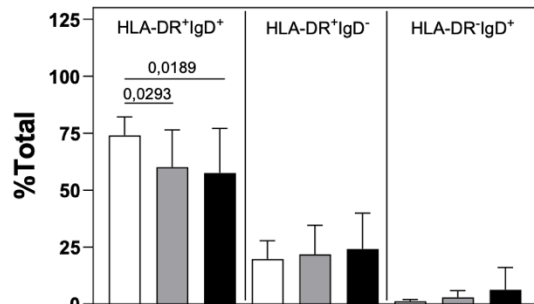
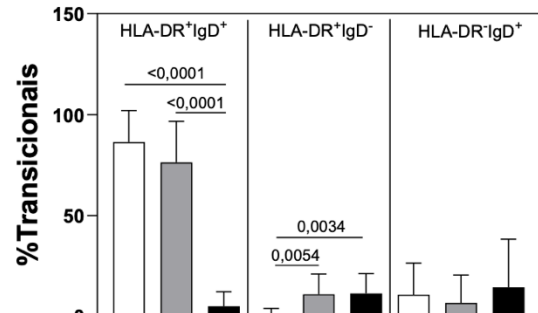
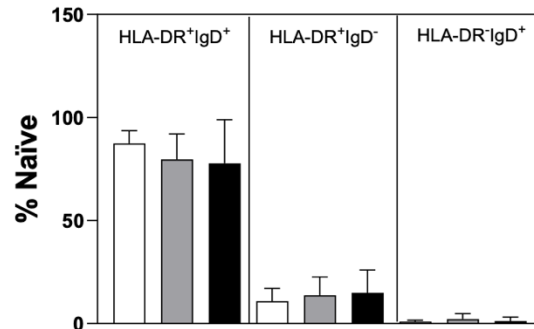
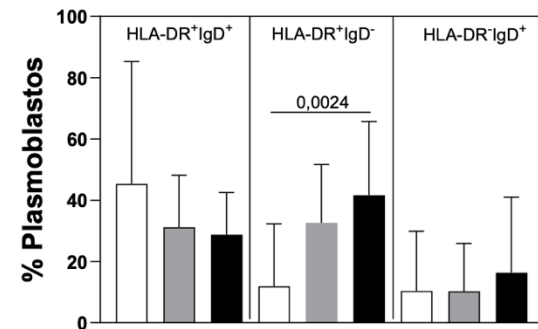


Figura 6. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos em pacientes acometidos com EM e NMOSD. As frequências de células B totais e de seus subtipos foram analisadas em indivíduos saudáveis (n = 10), EM (n = 21) e NMOSD (n = 21), esses representados pelas cores branco, cinza e preto, nessa ordem. **A:** Estratégia de

análise utilizada para o delineamento dos subtipos celulares nos três grupos. O fluxo incluiu o confinamento dos linfócitos, a seleção de eventos singlets, a identificação das células B (CD19⁺), a caracterização dos subtipos B com base na expressão de CD27 e CD38, e a detecção de plasmoblastos funcionalmente mais ativos por meio da marcação CD138⁺. **B:** frequência das células B totais. **C:** frequência das células B transicionais (CD27⁻CD38⁺⁺). **D:** frequência das células B *naïve* (CD27⁺CD38⁺). **E:** frequência de plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺). **F:** frequência de células de memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão.

4.3. Impacto da EM e da NMOSD na frequência de diferentes subtipos de células B segundo a expressão diferencial de HLA-DR e IgD.

Expressão de HLA-DR e IgD podem agregar mais informações quanto ao status de ativação e capacidade de apresentar antígenos para as células T. Nesse sentido, seguindo as estratégias de confinamento demonstradas na figura 7A, a percentagem de células B totais (Fig. 7B) e transicionais (Fig. 7C) positivos tanto para HLA-DR quanto para IgD, foi significativamente menor nos pacientes com EM e NMOSD quando comparado aos indivíduos saudáveis. Por outro lado, a frequência de células B transicionais (Fig. 7C) dentre os tipos HLA-DR⁺IgD⁻ foi maior nas amostras de pacientes com EM e NMOSD. Ademais, a proporção de plasmoblastos HLA-DR⁺IgD⁻ também foi maior nos dois grupos de pacientes, na qual esse incremento só se apresentou significativo no grupo NMOSD quando comparado ao grupo controle (Fig. 7E).

A**B****C****D****E**

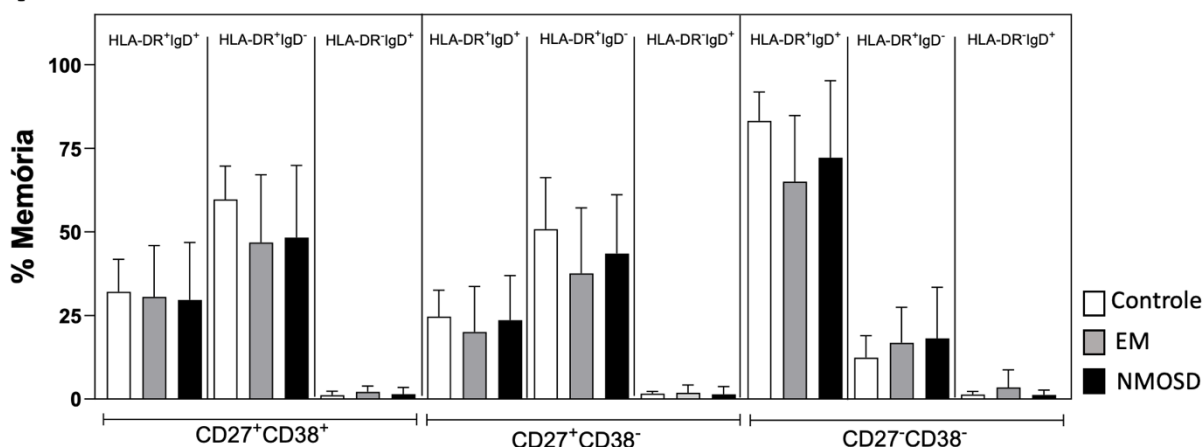
F

Figura 7. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos que expressam HLA-DR e IgD em pacientes acometidos com EM e NMOSD.

As frequências de células B totais e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis ($n = 10$), acometidos com EM ($n = 21$) e NMOSD ($n = 21$), esses representados pelas cores branco, cinza e preto, nessa ordem. **A:** Estratégia de análise utilizada para o delineamento dos subtipos celulares nos três grupos. O fluxo incluiu o confinamento dos linfócitos, a seleção de eventos singlets, a identificação das células B ($CD19^+$), a caracterização dos subtipos B com base na expressão de CD27 e CD38, e a seleção de células B transitórias com posterior análise da expressão dos marcadores de funcionalidade HLA-DR e IgD. **B:** frequências das células B totais que expressam HLA-DR e IgD. **C:** frequência das células B transitórias ($CD27^+CD38^{++}$) que expressam HLA-DR e IgD. **D:** frequência das células B *naïve* ($CD27^+CD38^+$) que expressam HLA-DR e IgD. **E:** frequência de plasmoblastos ($CD27^{++}CD38^{++}$; $CD27^{++}CD38^{++}CD138^+$) que expressam HLA-DR e IgD. **F:** frequência de células de memória ($CD27^+CD38^+$; $CD27^+CD38^-$; $CD27^-CD38^-$) que expressam HLA-DR e IgD. Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão.

Além da análise da frequência, obtenção dos valores de intensidade de fluorescência média (MFI, do inglês *mean fluorescence intensity*), pode nos fornecer pistas adicionais quanto a capacidade dessas células B serem mais imunogênicas ou tolerogênicas dada a expressão do HLA-DR e IgD. Nesse sentido, quando comparado com o grupo controle, a intensidade de expressão de HLA-DR nas células B transitórias e plasmablastos (Fig. 8C) de pacientes com EM e NMOSD foi maior. Por outro lado, maior expressão média de IgD em células B transitórias do grupo controle foi observada (Fig. 8C), enquanto a intensidade de expressão dessa imunoglobulina em plasmócitos foi maior nas amostras de pacientes com EM quando comparado ao grupo controle (Fig. 8C). Nenhuma diferença foi observada quanto a intensidade de expressão desses marcadores na superfície das células B totais, *naïve* e memória.

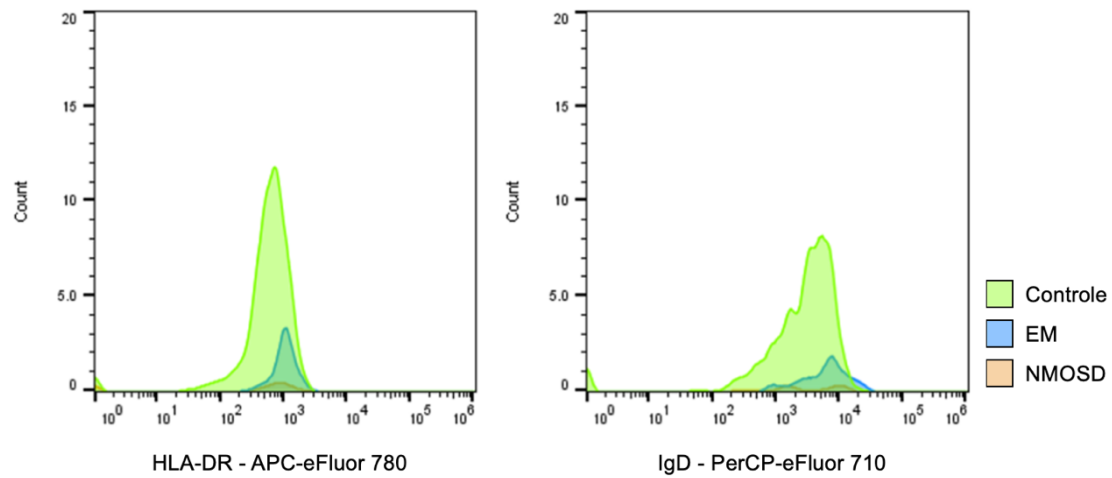
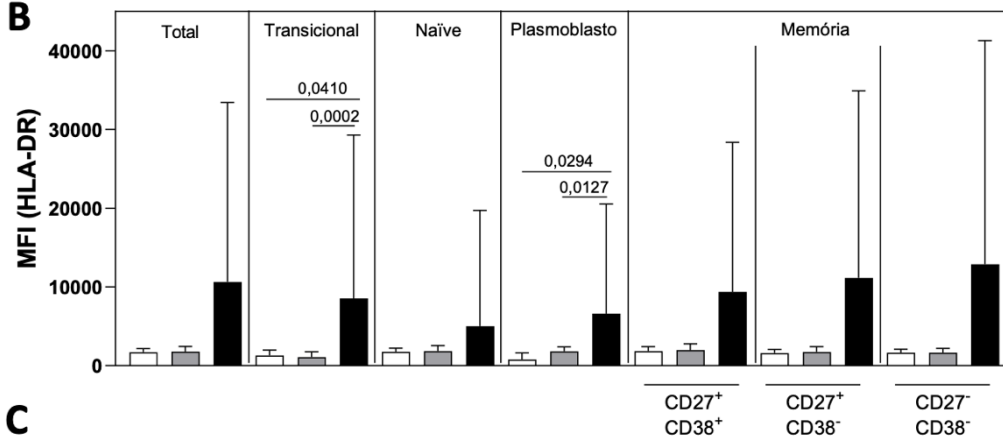
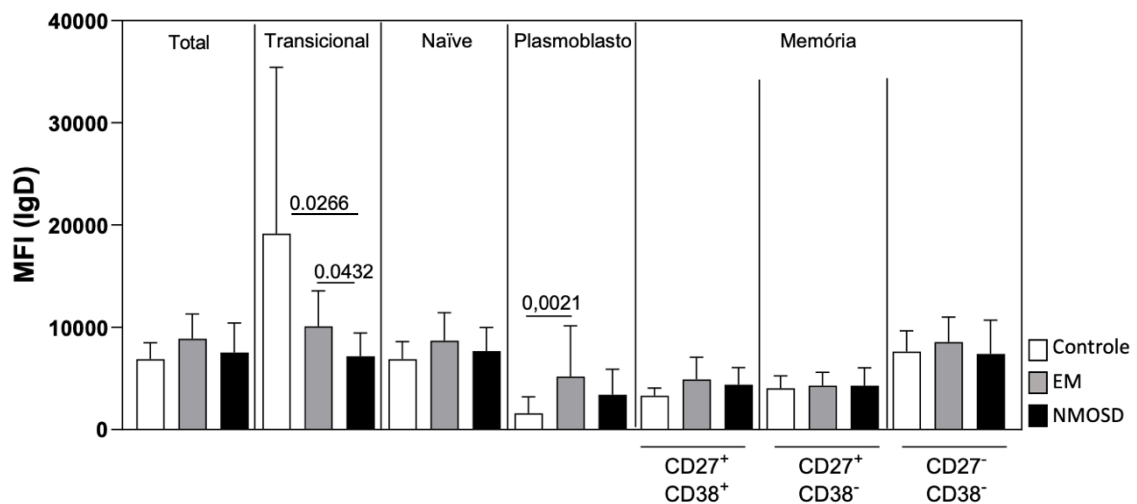
A**B****C**

Figura 8. Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores HLA-DR e IgD nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD. MFI de células B totais e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis (n = 10), acometidos com EM (n = 21) e NMOSD (n = 21). **A:** Representação gráfica da média da intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores HLA-DR e IgD em três indivíduos representativos de cada grupo: C03 (controle saudável), P051 (EM) e P049 (NMOSD), elucidados pelas cores verde, azul e laranja,

respectivamente. **B:** MFI referente ao HLA-DR das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), *naïve* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). **C:** MFI referente ao IgD das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), *naïve* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão. Os grupos controle, EM e NMOSD são representados pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente.

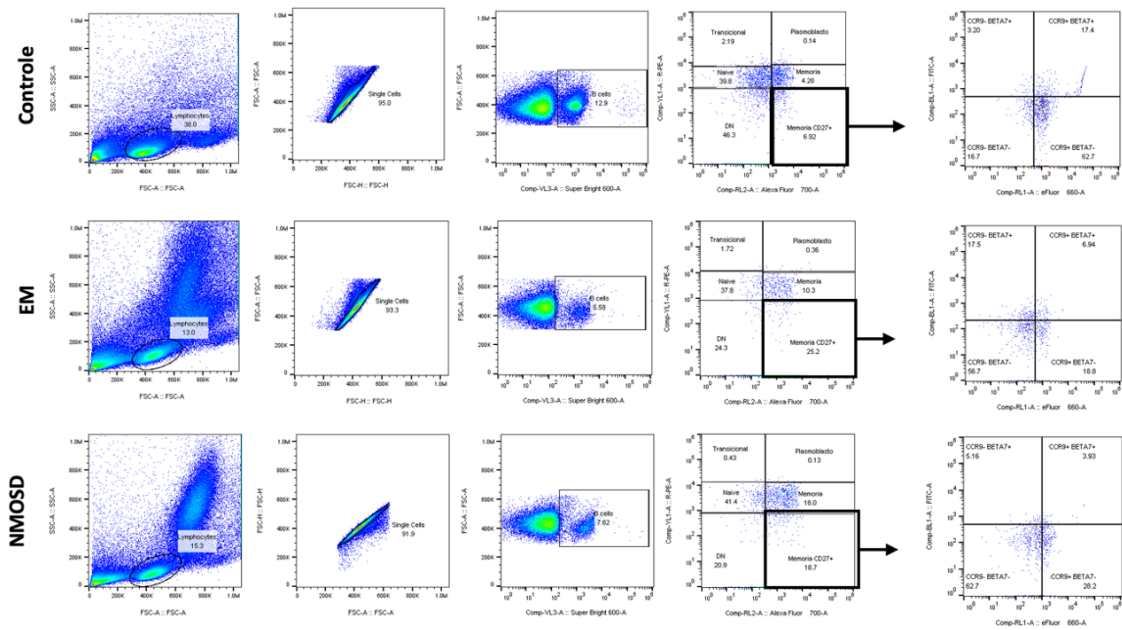
4.4. Avaliação da frequência de células B circulantes que expressam CCR9 e a integrina $\alpha_4\beta_7$ em pacientes acometidos com EM e NMOSD.

Classicamente, linfócitos CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ são originários na mucosa, particularmente intestinal (KADOWAKI, A., SAGA, R., LIN, Y., *et al.*, 2019). No presente estudo, seguindo as estratégias de confinamento demonstradas na figura 9A, como próximo objetivo, buscou-se avaliar a expressão desses marcadores de endereçamento intestinal nos subtipos de células B circulantes de acordo com a expressão de CD27 e CD38.

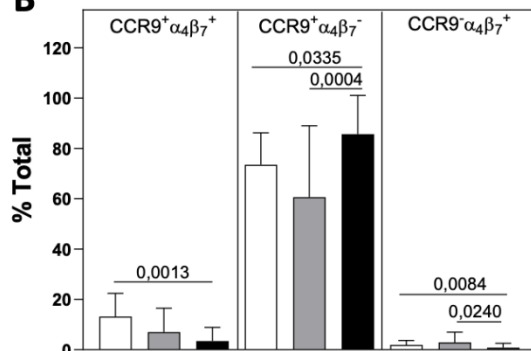
Conforme ilustrado na Figura 9, a análise dos subtipos de células B *naïve* (Fig. 9D) e de memória (Fig. 9F) revelou uma menor frequência de células CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ tanto em pacientes com EM quanto com NMOSD, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Em relação às células B totais, esse mesmo padrão foi observado apenas no grupo EM, quando comparado ao controle (Fig. 9B). Não foram identificadas diferenças significativas nas frequências das células B transicionais e dos plasmoblastos CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ entre os pacientes e os controles. Por outro lado, ao se considerar as populações de células B totais (Fig. 9B), *naïve* (Fig. 9D) observou-se um aumento na frequência do subtipo celular CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ em pacientes com NMOSD, quando comparado aos pacientes com EM. Dentre essas, apenas as células B totais CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ do grupo NMOSD apresentaram porcentagens superiores também em relação ao controle. No grupo EM, menor frequência de células B de memória (CD27⁻CD38⁻) CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ foi observada quando comparada aos indivíduos saudáveis (Fig. 9F). Por fim, ao se analisar os fenótipos celulares CCR9⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺, células B totais (Fig. 9B), *naïve* (Fig. 9D) e de memória (CD27⁺CD38⁻) (Fig. 9F) de pacientes com NMOSD mostraram-se em menor porcentagem quando comparadas aos grupos controle e EM, enquanto a frequência de plasmoblastos

CCR9⁻α4β7⁺ no grupo com EM foi superior ao grupo controle, sem diferença significativa com pacientes com NMOSD (Fig. 9E).

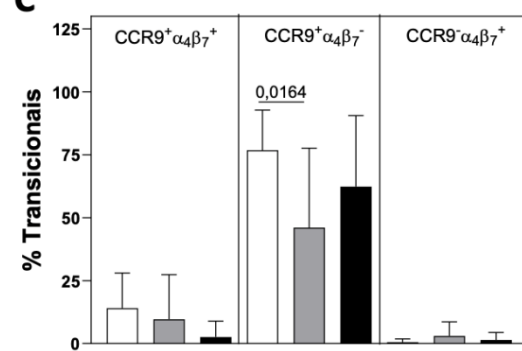
A



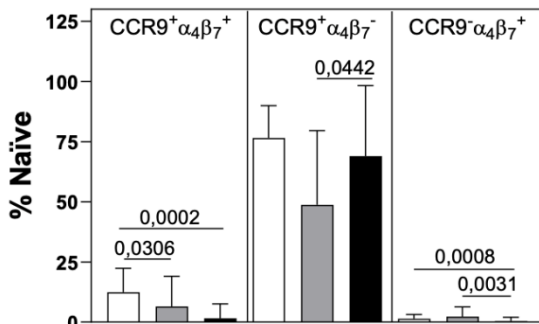
B



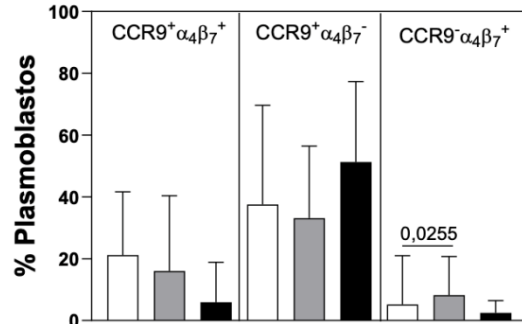
C



D



E



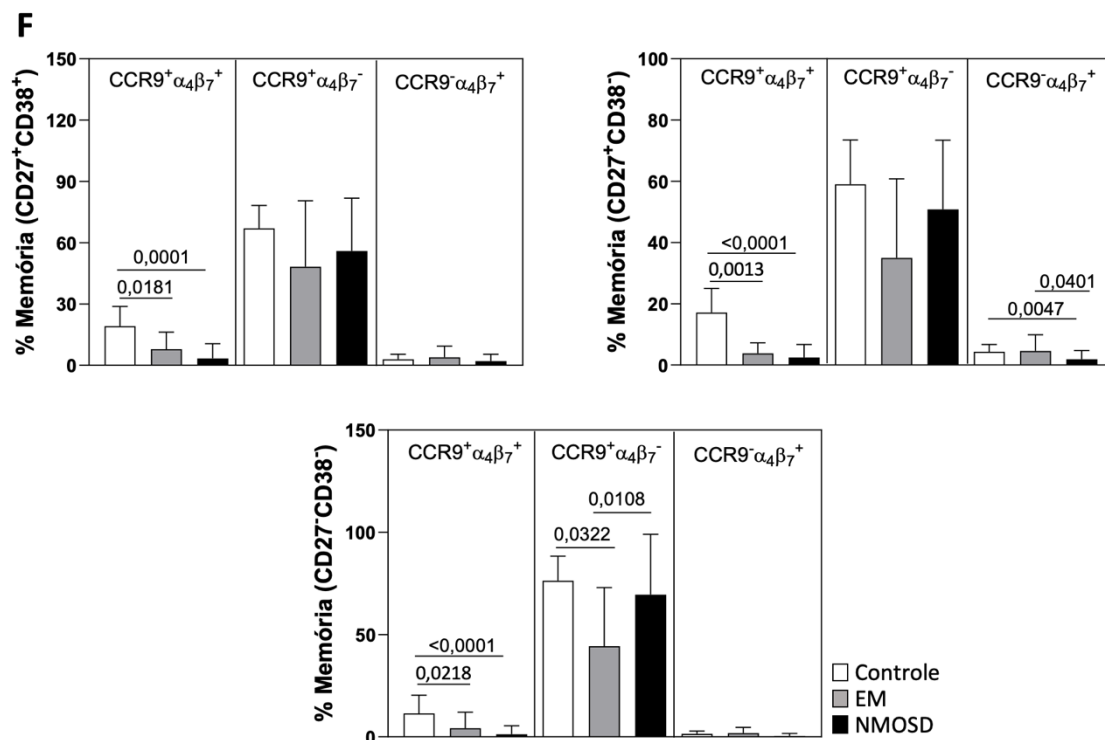


Figura 9. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos que expressam CCR9 e $\alpha_4\beta_7$ em pacientes acometidos com EM e NMOSD. As frequências de células B totais e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis ($n = 10$), acometidos com EM ($n = 21$) e NMOSD ($n = 21$). **A:** Estratégia de análise utilizada para o delineamento dos subtipos celulares nos três grupos. O fluxo incluiu o confinamento dos linfócitos, a seleção de eventos singlets, a identificação das células B ($CD19^+$), a caracterização dos subtipos B com base na expressão de CD27 e CD38, e a seleção de células B de memória ($CD27^+CD38^-$) com posterior análise da expressão dos marcadores de “homing intestinal”: CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. **B:** frequência das células B totais que expressam CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. **C:** frequência das células B transitórias ($CD27^+CD38^{++}$) que expressam CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. **D:** frequência das células B *naïve* ($CD27^-CD38^+$) que expressam CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. **E:** frequência de plasmoblastos ($CD27^{++}CD38^{++}$; $CD27^{++}CD38^{++}CD138^+$) que expressam CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. **F:** frequência de células de memória ($CD27^+CD38^-$; $CD27^+CD38^-$; $CD27^-CD38^-$) que expressam CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$. Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão. Os grupos controle, EM e NMOSD são representados pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente.

Quanto à intensidade de expressão, os valores médios de MFI do CCR9 foi superior nos subtipos de células B transitórias, *naïve* e memória ($CD27^-CD38^-$) dos pacientes com NMOSD quando comparado ao grupo EM (Fig. 10B). Com relação a proteína $\alpha_4\beta_7$, maior intensidade de expressão dessa integrina foi observada na superfície das células B totais (Fig. 10C) e de memória $CD27^+CD38^-$ de pacientes com NMOSD (Fig. 10C).

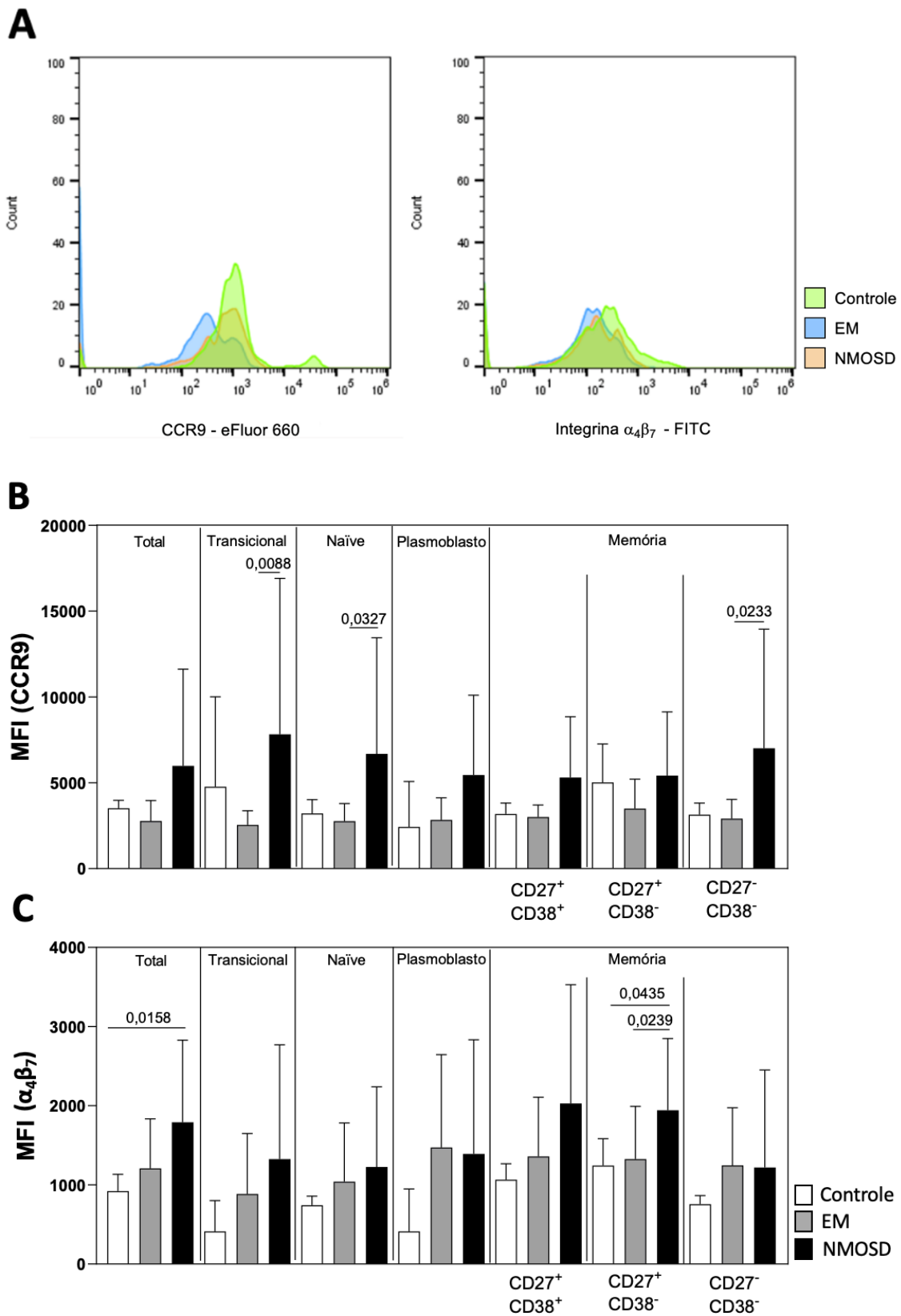


Figura 10. Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores CCR9 e $\alpha_4\beta_7$ nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD. MFI de células B totais e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis (n = 10), acometidos com EM (n = 21) e NMOSD (n = 21). **A:** Representação gráfica da mediana da intensidade de fluorescência (MFI)

dos marcadores CCR9 e integrina $\alpha_4\beta_7$ em três indivíduos representativos de cada grupo: C03 (controle saudável), P051 (EM) e P049 (NMOSD), elucidados pelas cores verde, azul e laranja, respectivamente. **B:** MFI referente ao CCR9 das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), *naïve* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺ CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). **C:** MFI referente a integrina $\alpha_4\beta_7$ das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), *naïve* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺ CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão. Os grupos controle, EM e NMOSD são representados pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente.

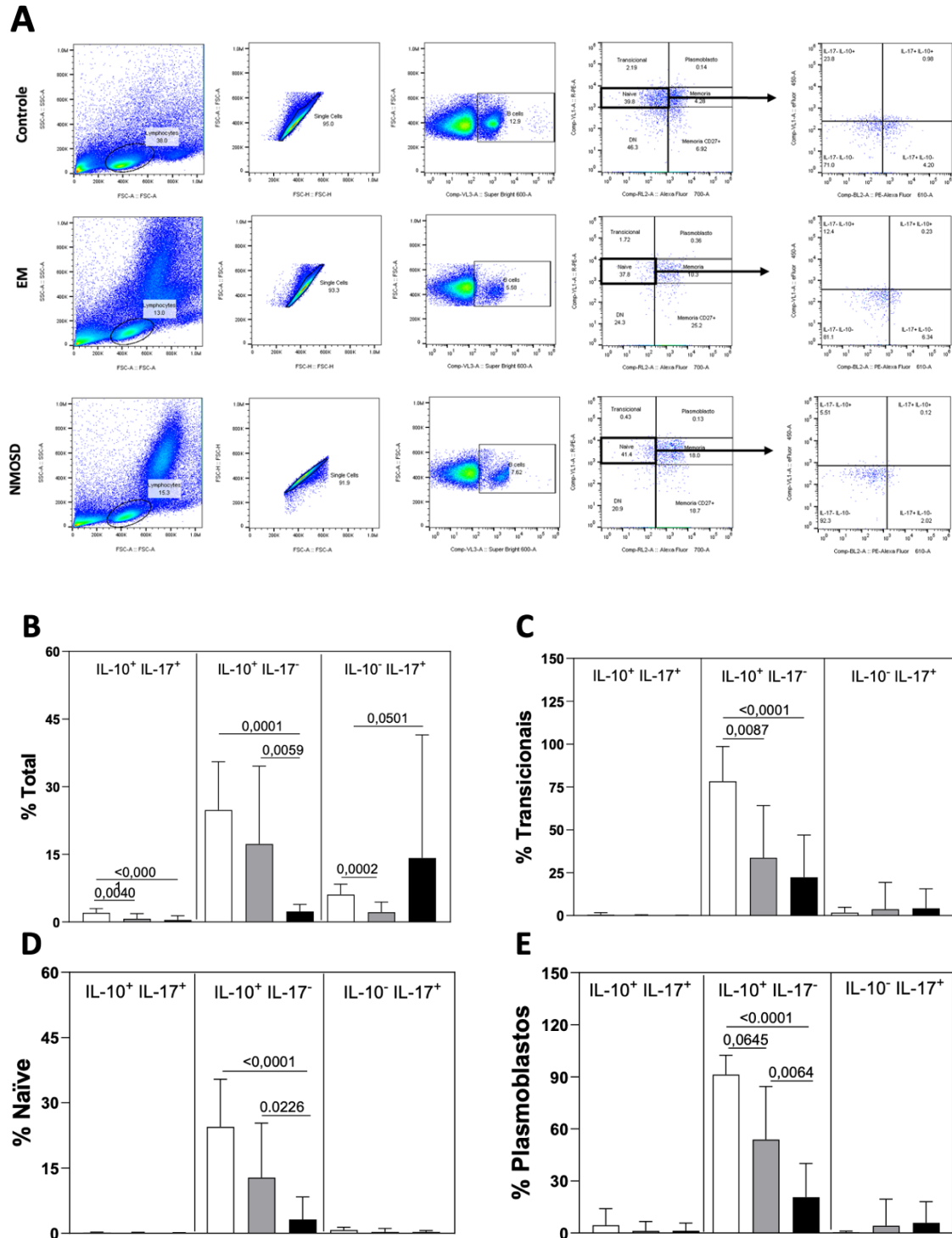
4.5. Impacto da EM e da NMOSD na frequência de células B que produzem IL-10 e IL-17.

Enquanto IL-10 tem sido associada a regulação da resposta imune, a IL-17 tem sido atrelada à várias doenças autoimunes, tais como EM e NMOSD (BURKETT, P.R., MEYER ZU HORSTE, G., KUCHROO, V. K, 2015). O objetivo subsequente consistiu em avaliar a frequência de diferentes subtipos de células B circulantes capazes de produzir IL-10 e/ou IL-17 seguindo a estratégia de confinamento demonstrada na figura 11A. De forma interessante, observou-se uma menor percentagem de células B totais (Fig. 11B), *naïve* (Fig. 11D), plasmablastos (Fig. 11E) e todos os subtipos de células B reguladoras (Fig. 11F). Dentre às células transicionais, a frequência do fenótipo 10⁺IL-17⁻ foi significativamente superior no grupo controle, sem diferença entre as amostras dos pacientes com EM e NMOSD (Fig. 11C). Ainda, em relação a esse mesmo fenótipo (IL-10⁺IL-17⁻), esse padrão de redução também foi observado ao comparar o grupo controle com os pacientes com EM no compartimento de plasmoblastos (Fig. 11E).

Em contrapartida, células produtoras de IL-17 circulantes (IL-10⁻IL-17⁺) pertencentes aos fenótipos de células B totais (Fig. 11B) e memória (CD27⁻CD38⁻) (Fig. 11F) apresentaram um maior percentual em indivíduos acometidos com NMOSD quando comparados ao grupo controle. No entanto, a frequência de células B memória (CD27⁻CD38⁻) IL-10⁻IL-17⁺ foi maior no grupo controle quando comparado aos pacientes (Fig. 11F).

Células B com fenótipo híbrido IL-10⁺IL-17⁺ foram particularmente identificadas nas populações de linfócitos B totais (Fig. 11B) e de memória

CD27⁺CD38⁻ (Fig. 11F), apresentando menor frequência nos grupos NMOSD e EM quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado, em relação as células de memória CD27⁻CD38⁻, essa diferença foi observada apenas entre o grupo NMOSD e o controle (Fig. 11F).



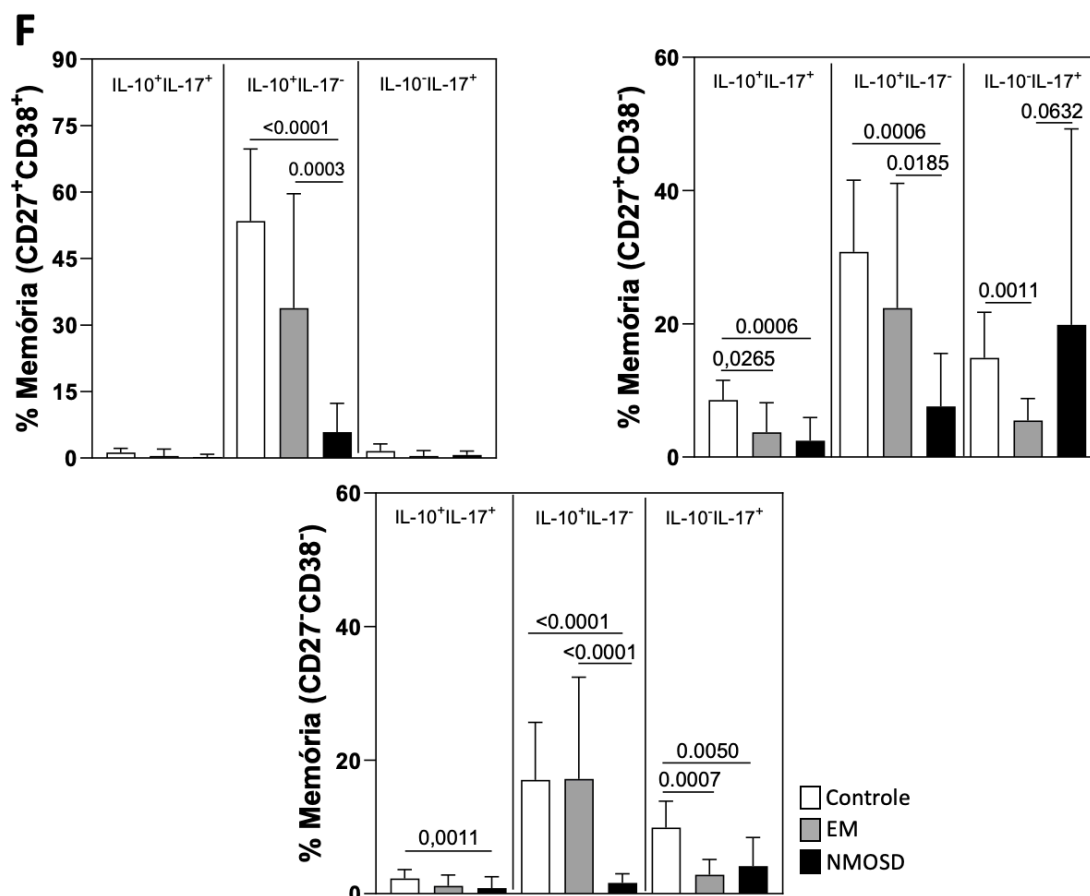
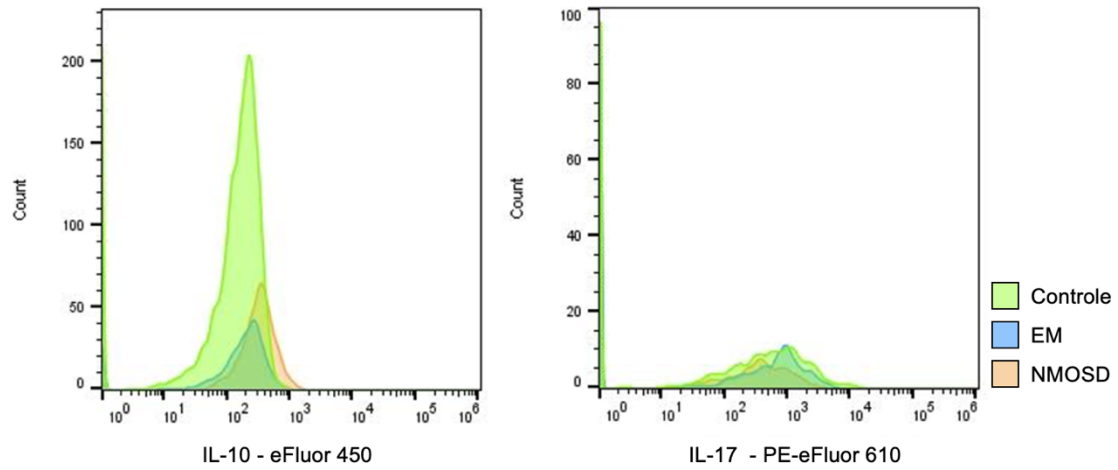


Figura 11. Estratégia de confinamento e comparação entre a frequência de células B totais e os subtipos produtores de citocinas IL-10 e IL-17 em pacientes acometidos com EM e NMOSD. As frequências de células B totais e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis (n=10), acometidos com EM (n=21) e NMOSD (n=21). **A:** Estratégia de análise utilizada para o delineamento dos subtipos celulares nos três grupos. O fluxo incluiu o confinamento dos linfócitos, a seleção de eventos singlets, a identificação das células B (CD19⁺), a caracterização dos subtipos B com base na expressão de CD27 e CD38, e a seleção de células B *naïve* com posterior análise da expressão intracelular das citocinas IL-10 e IL-17. **B:** frequência das células B totais que expressam IL-10 e IL-17. **C:** frequência das células B transicionais (CD27⁻CD38⁺⁺) que expressam IL-10 e IL-17. **D:** frequência das células B *naïve* (CD27⁻CD38⁺) que expressam IL-10 e IL-17. **E:** frequência de plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) que expressam IL-10 e IL-17. **F:** frequência de células de memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻) que expressam IL-10 e IL-17. Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão. Os grupos controle, EM e NMOSD são representados pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente.

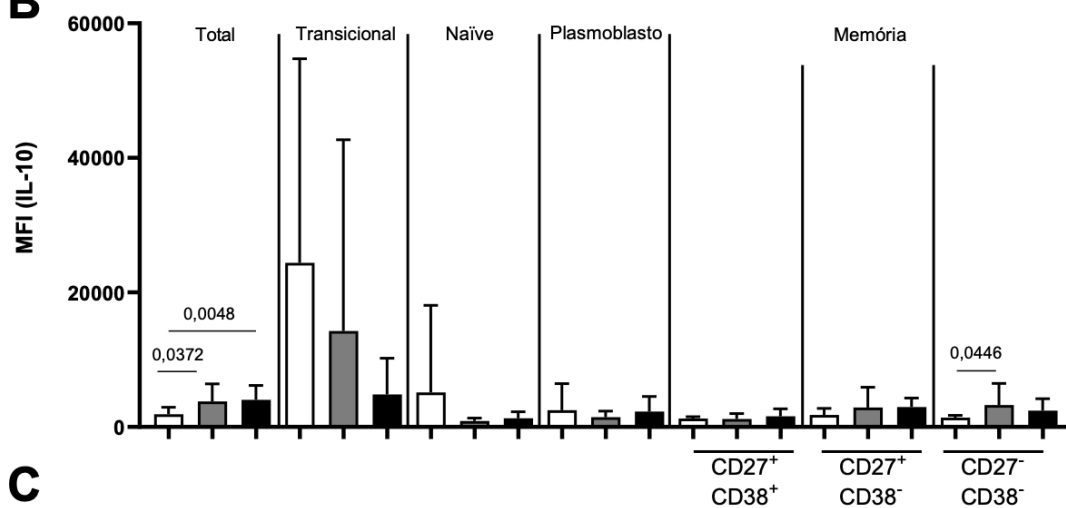
Interessantemente, apesar de todos os subtipos celulares observados IL-10⁺IL-17⁻ apresentarem um percentual menor no grupo NMOSD quando comparado ao restante (Fig. 11B – F), o MFI dessa mesma citocina foi superior nas células B totais dos pacientes com NMOSD quando comparado ao controle (Fig. 12B). Por outro lado, quando comparado aos indivíduos saudáveis, pacientes de ambos os grupos acometidos com tais condições

neuroinflamatórias apresentaram o MFI da citocina IL-17 menor em células B totais, naíve e todos os subtipos de células de memória (Fig. 11C).

A



B



C

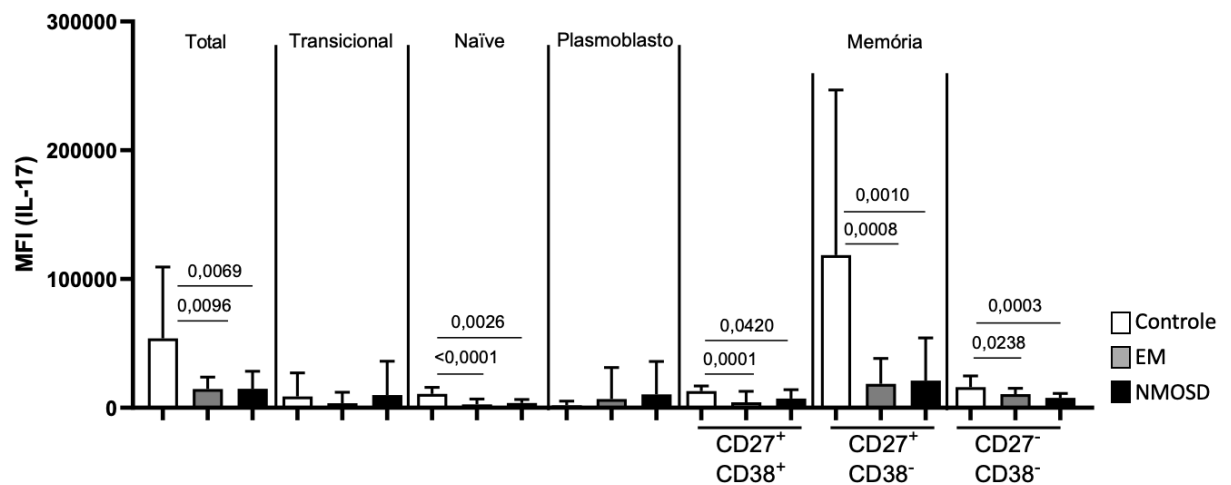


Figura 12: Média de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores IL-10 e IL-17 nos subtipos de células B em pacientes acometidos com EM e NMOSD. MFI de células B totais

e os subtipos foram avaliados em indivíduos saudáveis (n = 10), acometidos com EM (n = 21) e NMOSD (n = 21). **A:** Representação gráfica da média da intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores IL-10 e IL-17 em três indivíduos representativos de cada grupo: C03 (controle saudável), P051 (EM) e P049 (NMOSD), elucidados pelas cores verde, azul e laranja, respectivamente. **B:** MFI referente ao IL-10 das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), naíve (CD27⁺CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). **C:** MFI referente a IL-17 das células B totais, transicionais (CD27⁺CD38⁺⁺), naíve (CD27⁺CD38⁺), plasmoblastos (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) e memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻; CD27⁻CD38⁻). Na figura, as barras correspondem as médias e desvios-padrão. Os grupos controle, EM e NMOSD são representados pelas cores branco, cinza e preto, respectivamente.

4.7. Correlação entre subtipos de células B e a incapacidade neurológica em pacientes com EM e NMOSD.

Classicamente, as incapacidades neurológicas na EM e na NMOSD é aferida a partir do EDSS. Como demonstrado na tabela 3, a frequência de linfócitos B totais, transicionais, memória (CD27⁺CD38⁻, CD27⁻CD38⁻), identificados como sendo HLA-DR⁺IgD⁺, no grupo com EM foi negativamente correlacionado com a pontuação do EDSS. Ainda em relação ao grupo EM, células B totais, transicionais, naíve, memória (CD27⁺CD38⁺, CD27⁺CD38⁻) identificadas como IL-10⁺IL-17⁻ apresentaram correlação negativa quando relacionadas à pontuação do EDSS. Em contrapartida, células transicionais e plasmoblastos identificadas como IL-10⁻IL-17⁺ foram positivamente correlacionadas com o escore do EDSS. Quando analisado a correlação entre a expressão dos marcadores celulares CCR9 e a integrina $\alpha_4\beta_7$ junto a escala EDSS no grupo EM, células de memória (CD27⁺CD38⁺, CD27⁻CD38⁻) CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ apresentaram correlação negativa assim como as células naíve e memória (CD27⁺CD38⁺) CCR9⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺.

Por outro lado, as incapacidades neurológicas pertencentes aos pacientes com NMOSD foram positivamente correlacionadas com a proporção de células B totais HLA-DR⁺IgD⁻, transicionais IL-10⁻IL-17⁺, plasmoblastos IL-10⁻IL-17⁺ e células B de memória (CD27⁺CD38⁻) HLA-DR⁺IgD⁻. Em contrapartida, células B totais CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻, plasmoblastos CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻, memória (CD27⁺CD38⁺) CCR9⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ e memória (CD27⁺CD38⁻) IL-10⁺IL-17⁻ apresentaram correlação inversa com a pontuação do EDSS. Por fim, tanto na EM quanto na NMOSD, pontuação

do EDSS foi correlacionada diretamente com a frequência de plasmoblastos CD138⁺.

Tabela 2. Correlação entre os subtipos de células B e o grau de incapacidade neurológica (EDSS) em pacientes com EM e NMOSD.

	EDSS			
	EM ^a		NMOSD ^b	
	r	p	r	p
Total	0,3235	0,1526	0,2148	0,3497
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	-0,0369	0,8736	0,0916	0,6927
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,01320	0,9547	0,4686	0,0321
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,5354	0,0124	0,2938	0,1962
MFI HLA-DR	0,1548	0,5146	0,1773	0,4419
MFI IgD	-0,3486	0,1215	0,2771	0,2467
CCR9 ⁺ α4β7 ⁺	-0,2614	0,2523	0,1105	0,6336
CCR9 ⁺ α4β7 ⁻	-0,0878	0,7046	-0,5026	0,0202
CCR9 ⁻ α4β7 ⁺	0,1022	0,6595	0,4173	0,0598
MFI CCR9	-0,3185	0,1593	-0,2824	0,2149
MFI α4β7 ⁺	-0,1372	0,5532	0,1599	0,4886
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0, 035	0,8852	-0,2736	0,2300
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,4780	0,0284	-0,4091	0,051
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,2797	0,2323	0,3720	0,1415
Transicional	0,0785	0,7350	0,00602	0,9793
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,0366	0,8747	0,00610	0,9544
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,1864	0,4184	-0,2848	0,2109
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,3701	0,0986	0,1413	0,5233
MFI HLA-DR	0,1479	0,5337	0,2469	0,2805

MFI IgD	-0,3901	0,0891	0,4019	0,0518
CCR9 ⁺ α4β7 ⁺	-0,3715	0,0973	0,1566	0,4977
CCR9 ⁺ α4β7 ⁻	-0,1965	0,3934	0,2983	0,1891
CCR9 ⁻ α4β7 ⁺	-0,2071	0,3678	-0,3105	0,1707
MFI CCR9	0,0997	0,6672	0,1158	0,6173
MFI α4β7 ⁺	0,1037	0,5532	0,1879	0,4146
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,0336	0,8848	0,0377	0,8947
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,4692	0,0319	0,079	0,1733
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,5430	0,0110	0,4559	0,0366
Naïve				
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,0871	0,7072	0,0455	0,8446
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,1377	0,5517	0,3073	0,1755
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,2321	0,3113	-0,1012	0,6625
MFI HLA-DR	0,0935	0,6950	0,2416	0,2914
MFI IgD	-0,2938	0,0891	0,3044	0,071
CCR9 ⁺ α4β7 ⁺	-0,4391	0,0465	-0,1920	0,4043
CCR9 ⁺ α4β7 ⁻	0,1452	0,5299	-0,1539	0,5053
CCR9 ⁻ α4β7 ⁺	-0,4824	0,0328	0,1298	0,5750
MFI CCR9	0,0709	0,7600	0,2817	0,2160
MFI α4β7 ⁺	-0,1532	0,5072	-0,1830	0,4273
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,0914	0,6946	0,0361	0,8765
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,3999	0,0898	-0,0833	0,7345
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,3374	0,1457	0,0535	0,8188
Plasmoblasto				
CD138 ⁺	0,3788	0,0411	0,4111	0,0213

HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,2443	0,2858	0,3883	0,8673
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,2209	0,3359	0,5208	0,0155
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,1768	0,4432	-0,3823	0,0872
MFI HLA-DR	0,0062	0,9797	0,1633	0,4794
MFI IgD	0,0488	0,8334	0,2561	0,2081
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	-0,3775	0,0916	0,1456	0,5288
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁻	0,1182	0,6098	-0,5228	0,0150
CCR9 ⁻ α 4 β 7 ⁺	0,0099	0,9658	0,1884	0,4135
MFI CCR9	-0,2965	0,1919	-0,2034	0,3764
MFI α 4 β 7 ⁺	0,0933	0,6873	0,1589	0,5194
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,0114	0,9761	0,0685	0,7680
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	0,3003	0,1859	-0,1899	0,4225
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,4965	0,0220	0,1061	0,6471

Memória

CD27 ⁺ CD38 ⁺	0,1720	0,4559	0,3466	0,1237
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,1400	0,5451	-0,2212	0,3351
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,4055	0,0682	0,3210	0,1560
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,1281	0,5801	-0,0845	0,7142
MFI HLA-DR	0,0886	0,7181	0,2658	0,2574
MFI IgD	-0,3195	0,1580	0,3367	0,1091
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	0,0521	0,8224	0,2890	0,2142
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁻	-0,3690	0,0997	-0,1267	0,5842
CCR9 ⁻ α 4 β 7 ⁺	-0,4099	0,0650	-0,3940	0,0772
MFI CCR9	-0,3031	0,1876	-0,2536	0,2673
MFI α 4 β 7 ⁺	-0,0277	0,9049	-0,3379	0,1340
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,2198	0,3383	-0,3503	0,9772

IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,4581	0,0367	-0,1818	0,4563
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,3036	0,1931	0,0939	0,7021
CD27 ⁺ CD38 ⁻	0,0587	0,8003	0,1225	0,5969
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,0598	0,7969	0,1593	0,4904
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,1836	0,4257	0,4544	0,0385
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,4555	0,0380	-0,2858	0,2091
MFI HLA-DR	0,0019	0,9936	0,2889	0,2167
MFI IgD	-0,0693	0,7653	0,1781	0,4188
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	0, 2180	0,3413	0,2195	0,3391
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁻	0,2506	0,2732	0,0737	0,7508
CCR9 ⁻ α 4 β 7 ⁺	0,1476	0,5346	0,0737	0,7508
MFI CCR9	-0,0455	0,8447	-0,2938	0,1962
MFI α 4 β 7 ⁺	0,1934	0,4009	-0,3122	0,1988
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,1566	0,4877	0,0368	0,8741
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,5294	0,0136	-0,4687	-0,0430
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,1290	0,6099	0,0291	0,9085
CD27 ⁻ CD38 ⁻	0,2337	0,3079	0,1312	0,5709
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,2665	0,2430	0,0829	0,7206
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,4793	0,0279	0,3338	0,1392
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,3940	0,0772	-0,2448	0,2848
MFI HLA-DR	0,1640	0,4896	0,2563	0,2628
MFI IgD	-0,2297	0,3164	-0,3892	0,0551
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁺	-0,2231	0,3309	-0,1202	0,6039
CCR9 ⁺ α 4 β 7 ⁻	-0,4996	0,0211	0,2693	0,2378
CCR9 ⁻ α 4 β 7 ⁺	-0,2069	0,3814	-0,0521	0,8223

MFI CCR9	-0,2924	0,1983	-0,1278	0,5809
MFI $\alpha 4\beta 7^+$	-0,3627	0,1061	0,0110	0,9630
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,1889	0,4133	0,2978	0,2443
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,1135	0,6621	-0,1498	0,5404
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,2555	0,2911	0,2616	0,2943

A frequência de diferentes subtipos de células B (CD19⁺) [transicional (CD27⁻CD38⁺⁺), *naïve* (CD27⁻CD38⁺), plasmoblasto (CD27⁺⁺CD38⁺⁺) e células de memória (CD27⁺CD38⁻; CD27⁺CD38⁺ e CD27⁻CD38⁻)], capazes de expressar HLA-DR, IgD, CCR9, $\alpha 4\beta 7$, IL-10 e IL-17, foi avaliada em pacientes com esclerose múltipla (EM)^a e desordens do espectro da neuromielite óptica (NMOSD)^b através da citometria de fluxo. A porcentagem dos diferentes subtipos celulares foi correlacionada a gravidade da incapacidade neurológica, determinada pela pontuação do Escala Expandida do Estado de Incapacidade Neurológica (EDSS)^a. Elementos em preto representam resultados estatisticamente significativos; elementos em azul representam tendência de significância.

4.8. Correlação entre subtipos de células B e os níveis plasmáticos de LBP em pacientes com EM e NMOSD.

No grupo controle, observou-se correlação positiva entre os níveis plasmáticos de proteína que liga LPS (LBP) e a frequência de plasmoblastos com fenótipo CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7^+$, assim como em relação ao MFI da IL-17. Por outro lado, plasmoblastos IL-10⁺IL-17⁻ apresentaram correlação negativa com os níveis de LBP.

No grupo de pacientes com EM, observou-se uma série de correlações significativas entre diferentes subpopulações de células B e os níveis plasmáticos da LBP. De maneira geral, células B totais que expressam os marcadores CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7^+$, IL-10⁺IL-17⁺ e IL-10⁺IL-17⁻ apresentaram correlação positiva com os níveis de LBP. De forma semelhante, células B transicionais com fenótipo HLA-DR⁺IgD⁻ e CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7^+$, além de células *naïve* CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7^+$, também mostraram correlação positiva. Em relação às células B de memória, tanto o subtipo CD27⁺CD38⁻ (IL-10⁺IL-17⁺ e IL-10⁺IL-17⁻) quanto o CD27⁻CD38⁻ com expressão de CCR9⁺ $\alpha 4\beta 7^+$ ou IL-10⁺IL-17⁺ apresentaram associação positiva com LBP plasmático.

Por outro lado, foram identificadas correlações negativas em certos aspectos fenotípicos dessas mesmas populações celulares. Especificamente, a intensidade de expressão de IL-10 nas células B transicionais exibiu correlação negativa com LBP. O MFI da integrina $\alpha_4\beta_7$ em células *naïve* apresentou correlação negativa com os níveis circulantes de LBP. Ademais, correlação negativa também foi observada entre LBP e o MFI de $\alpha_4\beta_7$ em células B memória B CD27⁺CD38⁻ e MFI do CCR9 em células B de memória CD27⁻CD38⁻ de pacientes com EM.

Em pacientes com NMOSD, os níveis plasmáticos de LBP foram positivamente correlacionados com a intensidade de expressão do CCR9 em células B totais, *naïves*, plasmablastos e células B de memória CD27⁺CD38⁺. Correlações positivas e significativas entre LBP também foram observadas em amostras de pacientes com NMOSD que apresentam maior frequência de células transicionais HLA-DR⁺IgD⁺ e HLA-DR⁺IgD⁻, *naïve* CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻, memória CD27⁺CD38⁻ CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻ e CD27⁻CD38⁻ CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻. Em contrapartida, foram observadas correlações negativas para entre LBP com a porcentagem de células *naïve* CCR9⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ e memória CD27⁺CD38⁻.

Tabela 3. Correlação entre subtipos de células B e os níveis plasmáticos de LBP em pacientes com EM e NMOSD.

	LBP (ng/mL)					
	Controle ^a		EM ^b		NMOSD ^c	
	r	p	r	p	r	p
Total	-0,09524	0,8401	0,1423	0,5496	0,4809	0,0371
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,08661	0,9166	-0,03741	0,8756	-0,1308	0,5936
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	-0,07143	0,8820	0,1230	0,6055	-0,06231	0,8000
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,07143	0,8820	0,003670	0,9877	0,3151	0,1889
MFI HLA-DR	0,09524	0,8401	0,1925	0,4162	0,09566	0,6969
MFI IgD	0,0918	0,8017	0,1609	0,4980	-0,3010	0,2105
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,2619	0,5364	0,4792	0,0325	-0,3442	0,1491
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻	0,2381	0,5821	0,002645	0,9912	-0,1343	0,5835

CCR9 ⁺ α ₄ β ₇ ⁺	-0,4524	0,2675	0,09761	0,6822	0,2370	0,3285
MFI CCR9	0,3095	0,4618	-0,1353	0,5694	0,5406	0,0169
MFI α ₄ β ₇ ⁺	-0,1905	0,6646	-0,3414	0,1408	0,2551	0,2413
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	-0,07143	0,8820	0,4075	0,0833	-0,2675	0,2683
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,2857	0,5008	0,4715	0,0358	-0,2354	0,3602
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	-0,5000	0,2162	0,2092	0,3899	-0,04857	0,8587
MFI IL-10	-0,02381	0,9768	-0,3594	0,1196	-0,3005	0,2257
MFI IL-17	0,03770	0,9138	-0,06617	0,7817	-0,1571	0,5207
Transicional	-0,1870	0,6786	0,3279	0,1582	0,5113	0,0187
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	-0,2036	0,6294	-0,06424	0,7879	0,5894	0,0079
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,2571	0,5711	0,4817	0,0213	0,4348	0,0409
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,1916	0,6466	0,07990	0,7377	0,3847	0,1039
MFI HLA-DR	0,2857	0,5008	0,1398	0,5564	0,06933	0,7779
MFI IgD	0,2005	0,6981	-0,3705	0,1302	-0,09197	0,7243
CCR9 ⁺ α ₄ β ₇ ⁺	-0,3429	0,3929	0,4517	0,0341	-0,1612	0,5097
CCR9 ⁺ α ₄ β ₇ ⁻	0,2005	0,6390	-0,1666	0,4827	0,02881	0,9068
CCR9 ⁻ α ₄ β ₇ ⁺	0,1916	0,6466	0,1683	0,4781	0,08280	0,7361
MFI CCR9	0,2619	0,5364	-0,1549	0,5144	0,3054	0,2036
MFI α ₄ β ₇ ⁺	-0,2635	0,5226	-0,09546	0,6889	0,2355	0,3317
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	-0,2026	0,6429	0,1666	0,4827	0,2645	0,2738
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	0,02381	0,9768	0,1683	0,4781	0,06903	0,7789
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,05108	0,9143	0,002250	0,9925	0,2095	0,3894
MFI IL-10	-0,02381	0,6191	-0,4180	0,0666	-0,2221	0,3757
MFI IL-17	-0,1142	0,7857	-0,04517	0,8500	-0,1856	0,4469
Naïve	0,4431	0,2734	0,001752	0,9942	0,09043	0,7127

HLA-DR ⁺ IgD ⁺	-0,1429	0,7520	0,1109	0,6417	0,04917	0,8446
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,1190	0,7930	-0,04361	0,8552	0,05443	0,8248
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,04762	0,9349	-0,02216	0,9261	0,00702	0,9772
MFI HLA-DR	0,1667	0,7033	0,1699	0,4738	0,02820	0,9153
MFI IgD	0,1298	0,6841	0.09023	0,7052	-0,2975	0,2161
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	0,2755	0,5084	0,4803	0,0320	0,01151	0,9627
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻	-0,4524	0,0508	0,1296	0,5860	0,5125	0,0249
CCR9 ⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,4524	0,0751	0,007920	0,9736	-0,4455	0,0559
MFI CCR9	0,4524	0,2675	-0.1970	0,4052	0,5265	0,0206
MFI $\alpha_4\beta_7$ ⁺	0,09524	0,8401	-0,4421	0,0510	-0,2521	0,2478
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	-0,3234	0,2317	0,1502	0,5273	-0,07628	0,7563
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,1905	0,6646	0,1024	0,6859	0,01139	0,9642
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	-0,4048	0,1068	0,1598	0,5133	0,1401	0,5890
MFI IL-10	0,7857	0,0279	-0,1639	0,4899	0,01242	0,9610
MFI IL-17	0,3095	0,4618	0,01273	0,9575	0,0889	0,7247
Plasmoblasto	-0,3810	0,3599	0,3610	0,2048	0,4945	0,0330
CD138 ⁺	-0,1352	0,8000	0,2987	0,2009	0,3694	0,1591
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,02410	0,9633	0,2111	0,3161	0,2039	0,4024
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	-0,3274	0,2131	-0,009438	0,9685	-0,3663	0,1229
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,3551	0,3845	-0,1437	0,5455	-0,3990	0,0906
MFI HLA-DR	0,5238	0,1966	0,1947	0,4243	0,01141	0,9630
MFI IgD	0,2865	0,7018	0,007514	0,9749	0,03335	0,8922
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,2440	0,5667	0,3326	0,1532	0,09036	0,7215
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻	0,7638	0,0357	0,1019	0,4311	0,02681	0,9159
CCR9 ⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,4364	0,3214	-0,1997	0,3987	0,04047	0,8733
MFI CCR9	-0,4048	0,3268	-0,2917	0,2120	0,4835	0,0360

MFI $\alpha_4\beta_7^+$	-0,4791	0,2313	-0,1112	0,6437	0,3606	0,1294
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,5911	0,1714	0,09422	0,7012	-0,1334	0,5861
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,7365	0,0536	-0,03578	0,09120	0,08291	0,7436
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,4533	0,2876	0,0653	0,8541	0,1688	0,4898
MFI IL-10	-0,1905	0,6646	-0,1639	0,4899	-0,2943	0,2359
MFI IL-17	0,7092	0,0595	0,1054	0,6585	0,0957	0,7054

Memória

CD27 ⁺ CD38 ⁺	0,07143	0,8820	0,06016	0,8011	0,2078	0,4079
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	-0,1905	0,6640	0,07071	0,7671	-0,05170,	0,8386
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	-0,1667	0,7033	0,1484	0,5325	0,08782	0,7290
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	-0,4286	0,2992	0,008477	0,9717	0,04030	0,8738
MFI HLA-DR	0,1667	0,7033	0,1053	0,6680	0,2034	0,4182
MFI IgD	0,1322	0,7782	0,003008	0,9900	0,01206	0,9358
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7^+$	0,4762	0,2431	0,2063	0,3828	-0,0388	0,9032
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7^-$	-0,2857	0,5008	0,1171	0,6228	0,5378	0,0213
CCR9 ⁻ $\alpha_4\beta_7^+$	0,1905	0,6646	0,04313	0,8567	-0,1805	0,4735
MFI CCR9	0,3095	0,4618	-0,2135	0,3660	0,5529	0,0141
MFI $\alpha_4\beta_7^+$	0,04762	0,9349	-0,3000	0,1986	0,2054	0,3990
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	-0,1667	0,7033	0,1690	0,3931	0,1409	0,5771
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,2143	0,6191	0,4763	0,0865	-0,1730	0,5066
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,1860	0,6287	0,1265	0,6059	-0,1868	0,4884
MFI IL-10	0,2857	0,5008	-0,2280	0,6720	-0,01652	0,9481
MFI IL-17	0,1933	0,6251	0,1811	0,4449	0,3114	0,2084
CD27 ⁺ CD38 ⁻	0,04762	0,9349	-0,006520	0,9782	-0,4932	0,0319
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	0,04762	0,9349	-0,3087	0,1854	-0,1975	0,4178

HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,07143	0,8820	-0,03385	0,8873	-0,1448	0,5542
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,09534	0,8401	-0,1185	0,6188	-0,1223	0,6471
MFI HLA-DR	0,1810	0,6119	0,1398	0,5565	0,2446	0,3280
MFI IgD	0,1122	0,7834	0,08271	0,7289	-0,2703	0,2631
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,4048	0,3268	0,1457	0,5400	-0,2932	0,2231
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻	0,1667	0,7033	0,2731	0,2698	0,3423	0,1515
CCR9 ⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,1905	0,6646	0,2440	0,3012	-0,2787	0,2479
MFI CCR9	-0,3011	0,4977	-0,2782	0,2350	0,4827	0,0363
MFI $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,02381	0,9768	-0,5158	0,0199	0,05553	0,8221
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	-0,2143	0,6491	0,4317	0,0650	-0,1106	0,6522
IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	-0,2619	0,5364	0,3875	0,0914	0,01239	0,9611
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	0,5476	0,1710	0,2091	0,4051	0,3703	0,1433
MFI IL-10	-0,5238	0,1966	-0,1654	0,4850	-0,2953	0,2342
MFI IL-17	0,1667	0,7033	0,1053	0,6587	0,2705	0,2776
CD27 ⁻ CD38 ⁻	0,1190	0,7930	-0,3458	0,4196	-0,2195	0,3666
HLA-DR ⁺ IgD ⁺	-0,1078	0,8081	-0,1578	0,7121	-0,1860	0,4457
HLA-DR ⁺ IgD ⁻	0,2619	0,5364	0,2619	0,5364	0,2247	0,3551
HLA-DR ⁻ IgD ⁺	0,02381	0,9765	-0,0655	0,9112	0,1360	0,5787
MFI HLA-DR	0,1733	0,6430	0,2708	0,2481	0,09917	0,6803
MFI IgD	0,16754	0,6987	0,1398	0,5565	-0,3423	0,1515
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,1905	0,6646	0,4788	0,0327	-0,1766	0,4696
CCR9 ⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻	0,3571	0,3894	0,01699	0,9433	0,4949	0,0297
CCR9 ⁻ $\alpha_4\beta_7$ ⁺	-0,5000	0,2162	0,2338	-0,3212	-0,04203	0,8644
MFI CCR9	0,4524	0,3675	-0,3850	0,0937	0,3844	0,1042
MFI $\alpha_4\beta_7$ ⁺	0,04762	0,9346	-0,4391	0,0528	0,02051	0,9927
IL-10 ⁺ IL-17 ⁺	0,3566	0,3651	0,6603	0,0021	-0,2751	0,2543

IL-10 ⁺ IL-17 ⁻	0,02381	0,9768	0,1840	0,4796	-0,3864	0,1402
IL-10 ⁻ IL-17 ⁺	-0,4048	0,3268	-0,1815	0,4571	-0,07947	0,7689
MFI IL-10	-0,1905	0,6646	-0,2511	0,2855	-0,1780	0,4799
MFI IL-17	0,07143	0,8820	0,2301	0,3291	-0,3738	0,1265

A frequência de diferentes subtipos de células B (CD19⁺) [Transicional (CD27⁻CD38⁺⁺), naïve (CD27⁻CD38⁺), plasmoblasto (CD27⁺⁺CD38⁺⁺; CD27⁺⁺CD38⁺⁺CD138⁺) e células de memória (CD27⁺CD38⁺; CD27⁺CD38⁻ e CD27⁻CD38⁻)], capazes de expressar HLA-DR, IgD, CCR9, $\alpha_4\beta_7$, IL-10 e IL-17, foi avaliada em indivíduos saudáveis^a, pacientes com EM^b e NMOSD^c através da citometria de fluxo. A porcentagem dos diferentes subtipos celulares foi correlacionada com os níveis plasmáticos de LBP, dosados por ELISA. Elementos em preto representam resultados estatisticamente significativos; elementos em azul representam tendência de significância.

5. DISCUSSÃO

A esclerose múltipla (EM) e o transtorno do espectro da neuromielite óptica (NMOSD) são doenças desmielinizantes do SNC que, apesar de compartilharem algumas semelhanças, diferem acerca das apresentações clínicas e lesões patognomônicas têm auxiliado no diagnóstico diferencial e na compreensão de cada entidade nosológica (LOPES et al. 2021). Enquanto na maioria dos pacientes com NMOSD a doença envolve majoritariamente a presença de autoanticorpos dirigidos contra a AQP4 localizada nos pés dos astrócitos, o que leva estas células à morte por complemento, a EM é caracterizada pelo ataque às proteínas da bainha de mielina, mediada por células T produtoras de citocinas inflamatórias, particularmente IL-17 e IFN- γ (SEOK, J.M., CHO, W., CHUNG, Y.H. *et al.*, 2023). Portanto, enquanto a EM é uma doença desmielinizante primária, a NMOSD é uma astrocitopatia com desmielinização secundária. Apesar do papel das células T mielina-específicas nas lesões características da EM, a identificação de folículos linfoides ectópicos ricos em células B abaixo das meninges nos pacientes com formas progressivas desta doença (NEGRON *et al.* 2018), traz uma nova compreensão do papel da imunidade humoral no pior desfecho da doença.

Dessa forma, o presente estudo avaliou os diferentes subtipos de células B circulantes em pacientes com EM e NMOSD e, de maneira geral, nós observamos não apenas uma maior frequência de células B transitórias e de plasmoblastos com perfil mais imunogênico (HLA-DR⁺IgD⁻) em pacientes com NMOSD em comparação aos indivíduos saudáveis, como também um percentual significativamente mais elevado dessa primeira população ativada em pacientes com EM em relação ao grupo controle.

Quanto às células B de memória, Negron e colaboradores (2018) identificaram que a presença maciça de eFLs em áreas de meninges adjacentes a lesões neurodegenerativas em pacientes com EMSP se correlacionou com um subconjunto de células B de memória IgD⁻CD27⁻ anormalmente expandido. Um estudo de Menard e colaboradores (2016) demonstraram que lúpus eritematoso sistêmico, doença autoimune de base humoral, foi associada a expansão de células B CD27⁻IgD⁻. Curiosamente, observamos uma frequência

significativamente maior de células B de memória DN (CD27⁻CD38⁻) no grupo controle em comparação aos pacientes com EM. Este achado contraria, à primeira vista, a expectativa gerada por estudos anteriores, que descrevem a expansão de subpopulações DN em condições autoimunes, associando-as a fenótipos inflamatórios e diferenciação em plasmócitos autorreativo. Todavia, de acordo com Chung e colaboradores (2023), tais fenótipos de memória podem ser classificados em, ao menos, 4 (quatro) subtipos (DN1–DN4), os quais apresentam diferenças fenotípicas, funcionais e contextuais relevantes. Dessa forma, dentre esses perfis celulares, células de memória DN1 (CD27⁻CXCR5⁺CD21⁺CD11c⁻) são descritas como células de provável origem folicular, dependendo da ativação via células T_{FH}, sendo aquelas precursoras benignas de memória comuns em indivíduos saudáveis, assim, associado a perfis menos inflamatórios. Por outro lado, células de memória DN2 (CD27⁻CXCR5⁻CD21⁺CD11c⁺) são descritas como células de origem extrafolicular, as quais sofrerão ativação via receptores semelhantes ao tipo toll (TLR7) e citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-21), sendo essas responsáveis por promover respostas inflamatórias rápidas, pois não há o processo de maturação via centro germinativo. Infelizmente, considerando o painel de citometria empregado neste estudo o qual se restringe à detecção dos marcadores CD27 e CD38, não foi possível discriminar com precisão os diferentes subtipos fenotípicos da população DN. Dito isso, a maior frequência dessa população observada entre os indivíduos do grupo controle quando comparado ao grupo de pacientes diagnosticados com EM poderia eventualmente refletir uma predominância do subtipo DN1, descrito na literatura como mais prevalente em indivíduos saudáveis e associado a perfis imunológicos menos inflamatórios. No entanto, a confirmação dessa hipótese demanda a utilização de marcadores adicionais (haja vista, CXCR5, CD21, CD11c e T-bet) que permitiriam uma estratificação mais robusta e acurada dessas células.

Ainda, desequilíbrio na proporção de diferentes subtipos de células B de memória pode se relacionar com a formação de plasmoblastos. Pacientes com Miastenia Gravis, plasmoblastos derivados de células B de memória CD27⁺ podem desencadear recaídas da doença (LEE, D.S.W., ROJAS, O.L., GOMMERMAN, J.L, 2021). Tais dados podem nos auxiliar acerca do

entendimento da tendência observada, na qual identificou-se uma correlação positiva entre os níveis circulantes de células B de memória CD27⁺CD38⁺HLA-DR⁺IgD⁻ com o grau de incapacidade neurológica em pacientes com EM, assim como da correlação positiva entre as células B de memória CD27⁺CD38⁺HLA-DR⁺IgD⁻ com o grau de incapacidade de pacientes com NMOSD. E, para corroborar com essas análises, maior frequência de plasmoblastos mais funcionais (CD138⁺) (MCCARRON *et al.* 2017) não apenas foi identificada em ambos os grupos clínicos (NMOSD e EM), mas também a frequência dessas foi correlacionada, de forma positiva com pontuação do EDSS. Levando-se em consideração que NMOSD é mais grave que a EMRR, e que a progressão da EM para a forma neurodegenerativa tem sido associada à presença de células B no SNC, é provável que a presença de plasmoblastos mais eficientes esteja associada à neurodegeneração nos pacientes com EM aqui avaliados. Se consolidado em um número maior de pacientes, esses achados impactam no manejo terapêutico diferenciado na EM em pacientes que apresentam um perfil mais humoral da doença.

Um outro achado interessante foi a menor proporção de células HLA-DR⁺IgD⁺ entre as células B totais e transicionais em pacientes com EM e NMOSD quando comparado aos indivíduos saudáveis. Diferente das imunoglobulinas IgA, IgE, IgG e IgM que são amplamente estudadas, a função da IgD ainda não é muito compreendida (GUTZEIT, CHEN & CERUTTI, 2018). Muitos estudos apontam que a elevada presença de IgD, associada a uma baixa expressão de IgM, na superfície de células B seria indicativo de linfócitos anérgicos presentes no sangue periférico e tecidos linfoides secundários, sendo visto como um mecanismo de autotolerância (ZIKHERMAN, PARAMESWARAN, WEISS, 2012; SABOURI *et al.* 2016; GUTZEIT, CHEN e CERUTTI, 2018). Em contraste, a sinalização via HLA-DR amplifica a ativação das células B (TABATA *et al.*, 2000). Portanto, é possível que expansão de subtipos de células B HLA-DR⁺IgD⁺ esteja associada a melhor prognóstico das doenças aqui estudadas assim como os fenótipos HLA-DR⁻IgD⁺, visto que foi possível observar correlações negativas entre células transicionais e células de memória (CD27⁺CD38⁻, CD27⁻CD38⁻) HLA-DR⁻IgD⁺ circulantes com as pontuações adquiridas por meio da escala de incapacidade em pacientes com EM. Portanto,

mapeamento diferencial dos subtipos dominantes de plasmoblastos pode ajudar na definição da gravidade da EMRR e da NMOSD.

Citocinas como IL-10 e IL-17 têm sido implicadas em proteção e patogênese de muitas doenças autoimunes, tais como EMRR e NMOSD (CARTER NA., *et al.*, 2011). Se comparado aos indivíduos saudáveis, assim como pacientes acometidos com a EM, a frequência de células IL-10⁺IL-17⁻ dentre essas B totais, transicionais, naïve, plasmoblastos e memória (CD27⁺CD38⁺, CD27⁺CD38⁻, CD27⁻CD38⁻) foi menor nos pacientes com NMOSD. Neste contexto, alguns estudos de autoimunidade em modelos animais demonstraram que a deficiência de células B produtoras de IL-10 e TGF- β aumentou a suscetibilidade ao desenvolvimento de EM e LES (MATSUSHITA *et al.* 2008; CARTER NA, *et al.* 2011; RAY A, *et al.* 2011). Este resultado está parcialmente de acordo com outros estudos que demonstram uma relação entre resposta terapêutica satisfatória dos pacientes com EMRR ao tratamento com IFN- β , fumarato de dimetila e fingolimode e aumento da frequência de células B transicionais e *naïves* circulantes capazes de produzir altos níveis de IL-10 associadas à redução da proporção de células B IgD⁻ de memória (CLAES N. *et al.*, 2014; GRUTZKE B *et al.* 2015; LI R *et al.* 2017). Além disso, um estudo de Grutzke e colaboradores (2015) descobriu que células B produtoras de IL-10, induzidas pelo tratamento com fingolimode, mostraram capacidade de migrar para o SNC e de reduzir a gravidade da doença. Portanto, é possível que esse aumento na frequência de células B transicionais e plasmoblastos com perfil mais regulador observado nos pacientes com EM esteja particularmente associado à terapia modificadora de doença. Por outro lado, células B mais imunogênicas (HLA-DR⁺IgD⁻) devem estar relacionadas a pior desfecho das doenças autoimunes de fundo humoral. De fato, apesar de preliminares, os resultados indicam que as células B totais, plasmoblastos, memória (CD27⁺CD38⁻), com fenótipo HLA-DR⁺IgD⁻, se relacionaram positivamente com maior pontuação do EDSS nos pacientes com NMOSD. Além disso, células B transicionais IL-10⁻IL-17⁺ apresentaram correlação positiva com a escala EDSS tanto na EM quanto na NMOSD, e um padrão semelhante foi observado em plasmoblastos derivados do sangue periférico de pacientes com EM. É possível que essas células, por produzir IL-17, amplifiquem a diferenciação de subtipos

de células Th17 patogênicas (MA S, *et al.*, 2019), evento esse que pode estar associado à disbiose intestinal.

As interações biológicas entre a microbiota intestinal, intestino e principalmente células T CD4⁺ são complexas e podem impactar profundamente na saúde ou na suscetibilidade ao desenvolvimento de reações de hipersensibilidades, tais como autoimunidade. A disbiose intestinal tem sido associada à EM e a NMOSD (SHIM JA, RYU JH, JO Y, *et al.*, 2023; MOUSA WK, CHEHADE F, HUSBAND S., 2022), e os mecanismos por trás dessa relação adversa é assunto de intensa investigação visto que muitas dessas células acessam naturalmente o SNC. Na disbiose intestinal, a presença de certos microrganismos comensais no intestino, especialmente SFB, as quais induzem fortemente a diferenciação de células Th17 a partir de células T naïve. Esses microrganismos ativam células apresentadoras de antígeno da lâmina própria, levando à produção de citocinas como IL-6, IL-1 β e TGF- β — fundamentais para a polarização Th17 (IVANOV *et al.*, 2009). O crescimento preferencial de bactérias patogênicas, como algumas do filo *Prevotella* (LARSEN, 2017), associadas a maior permeabilidade intestinal, tende a favorecer o surgimento de células Th17 produtoras de IFN- γ as quais podem expressar em sua superfície CCR6, assim, sendo direcionadas ao SNC (MOUSA WK, CHEHADEH F, HUSBAND S. 2022; SHIM JA, RYU JH, JO Y, HONG C. 2023). Periféricamente, linfócitos T oriundos do intestino são identificados pela co-expressão do CCR9 e da integrina $\alpha_4\beta_7$, moléculas responsáveis por direcionar os linfócitos para área a lâmina própria e tecidos linfoides do intestino, regiões que expressam os seus respectivos ligantes, CCL25 e MadCAM-1 (SCHMUTZ, C., CARTWRIGHT, A., WILLIAMS, H., *et al.*, 2010). Apesar do intestino ser rico em células B, pouco é explorado sobre a relação entre a presença de células B que expressam esses receptores de endereçamento para a mucosa do intestino com doenças autoimunes.

Em condições homeostáticas, indivíduos saudáveis não imunizados apresentam 80% de suas células plasmáticas circulantes (ASCs) presentes no sangue periférico as quais expressam IgA quanto os receptores de quimiocina CCR10 e da integrina $\alpha_4\beta_7$ (MEI *et al.*, 2009). Esses achados sugerem uma predominância, no sangue periférico, dessas células derivadas de respostas

imunes da mucosa. Dessa forma, tais leucócitos não apenas mantêm a capacidade de retornar aos tecidos pertencente às mucosas, mas também foram identificadas na medula óssea, assim, indicando sua plasticidade migratória e possível contribuição para a imunidade sistêmica e local. DCs CD103⁺ derivadas do GALT demonstraram ser essenciais na indução dessas moléculas de homing em ASCs, especialmente em ambientes ricos em ácido retinóico, evidenciando que a redução da metabolização da vitamina A pode comprometer essa via específica em doenças intestinais inflamatórias (MORA; VON ANDRIAN, 2009). Ademais, em modelos animais de colite induzida, já foi observado que a redução na sinalização mediada por ácido retinóico foi responsável pela diminuição significativa da expressão de CCR9 e da integrina $\alpha_4\beta_7$ no intestino desses em comparação ao grupo controle (LI *et al.*, 2022). Embora existam poucos estudos em humanos que descrevam diretamente a relação entre a diminuição dos marcadores CCR9 e $\alpha_4\beta_7$ e o processo patológico em si, é possível observar a redução de tais marcadores em contextos inflamatórios. No presente estudo, e de forma interessante, a frequência de células B naïve e memória (CD27⁺CD38⁺, CD27⁺CD38⁻, CD27⁻CD38⁻) CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁺ foi menor nos indivíduos acometidos com ambas as condições neuroimunológicas quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, quando analisado as células B totais, naïve e memória (CD27⁻CD38⁻) com o fenótipo CCR9⁺ $\alpha_4\beta_7$ ⁻, pacientes pertencentes ao grupo NMOSD apresentaram uma maior porcentagem desses subtipos celulares quando comparado aos pacientes acometidos com EM. Previamente, estudos revelaram a presença abundante de monócitos CCR9⁺ em pacientes com artrite reumatoide quando comparado aos indivíduos saudáveis (SCHMUTZ *et al.*, 2010). Além disso, a frequência de células T CD4⁺CCR9⁺ no sangue periférico encontra-se aumentada em pacientes com doenças gastrointestinais, como dispepsia funcional (LIEBREGTS *et al.*, 2011) e doença de Crohn (PAPADAKIS *et al.*, 2001). No modelo experimental da EM, sinalização via TLR-4, por regular a expressão de CCL25/CCR9, favorece a infiltração de células Th17 no parênquima cerebral nos camundongos com EAE (ZHANG *et al.*, 2019). Quando comparado ao grupo com EM, a intensidade de expressão de CCR9 sobre células B transicionais, naïve e memória (CD27⁻CD38⁻) foi maior no grupo

NMOSD. Todavia, em nosso estudo, a frequência linfócitos $\text{CCR9}^+\alpha_4\beta^+$ entre as células B virgens e células de memória $\text{CD27}^+\text{CD38}^-$, assim como o subtipo de memória $\text{CD27}^+\text{CD38}^+ \text{CCR9}^-\alpha_4\beta^+$, foi correlacionado negativamente com a pontuação do EDSS nos pacientes com EM. Ainda, proporção de linfócitos $\text{CCR9}^+\alpha_4\beta^-$ entre as B de memória $\text{CD27}^-\text{CD38}^-$ nos pacientes com EM e em plasmoblastos na NMOSD correlacionou-se negativamente com a gravidade da incapacidade neurológica. Apesar da necessidade de incluir marcadores adicionais que forneçam mais pistas quanto ao perfil funcional dessas células com expressão diferencial de CCR9 e da integrina $\alpha_4\beta_7$, tal como a expressão de IL-10 e IL-17, essa relação inversa observada no presente estudo pode indicar migração preferencial para o SNC onde podem proteger ou favorecer novas recaídas clínicas.

O papel funcional entre a integrina $\alpha_4\beta_7$ e MAdCAM-1 para o homing intestinal de células B é evidenciada por meio da redução de ASC IgA⁺ observada em modelos animais que não expressam β_7 ou MAdCAM-1 (SCHIPPERS et al., 2009). Ademais, Tyler e colaboradores (2021) observaram em modelos animais que células T provenientes do baço, lâmina própria e sangue periférico expressavam predominantemente $\alpha_4\beta_1$, enquanto a linhagem de células B expressavam $\alpha_4\beta_7$. Todavia, a expressão dessa integrina na superfície não modificou durante a inflamação, não diferenciando entre as células T ou B isoladas do cólon de camundongos IL-10^{-/-} inflamados e não inflamados. Por outro lado, Müller e colaboradores (2021) demonstraram que, durante a infecção por COVID-19 há uma queda na frequência de células T $\alpha_4\beta_7^+$ e B $\alpha_4\beta_7^+$ circulantes. Em nosso estudo, quando comparado com o grupo controle e pacientes com EM, menor frequência de células B totais, naïve e memória ($\text{CD27}^+\text{CD38}^-$) com fenótipo $\text{CCR9}^-\alpha_4\beta_7^+$ foi identificado no sangue periférico de pacientes com NMOSD. Por outro lado, a intensidade de expressão de CCR9 nas células B totais e memória ($\text{CD27}^+\text{CD38}^-$) quando comparado ao grupo EM e saudável. Coletivamente, esses achados, ainda que preliminares, apontam para um envolvimento de eventos na mucosa intestinal dentro do compartimento das células B que podem estar implicados na EM e na NMOSD, tal como a translocação microbiana.

Produzida principalmente pelo fígado durante a resposta de fase aguda, a proteína de ligação ao lipopolissacarídeo (LBP, do inglês, lipopolysaccharide-binding protein) é reconhecida por sua grande vantagem de se apresentar como um marcador indireto de transmigração bacteriana de meia-vida longa, assim, possuindo como função a ativação do complexo de sinalização CD14/TLR4 por meio de sua ligação ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, dessa forma, desencadeando respostas imunológicas contra a esse antígeno (KOUTSONAS et al., 2015). Em pacientes com EM alterações na permeabilidade intestinal têm sido associadas à presença de biomarcadores inflamatórios, como o LPS e a LBP. Evidências indicam que níveis elevados de LPS e LBP no sangue desses pacientes correlacionam-se com o aumento da produção de IL-6 e com a ativação de células Th17, configurando uma resposta imunológica periférica de caráter pró-inflamatório, a qual pode refletir e potencialmente amplificar mecanismos patogênicos ativos no sistema nervoso central (CAMARA-LEMARROY et al., 2018). No presente estudo, a análise da correlação entre níveis plasmáticos de LBP e subpopulações de células B revelou padrões distintos entre os grupos avaliados. No grupo controle, níveis circulantes de LBP foram correlacionados positivamente e negativamente com a frequência de plasmoblastos $CCR9^+ \alpha_4\beta_7^-$ e plasmoblastos $IL-10^+ IL-17^-$, respectivamente. Em pacientes com EM, múltiplas subpopulações de células B apresentaram correlação positiva com LBP, incluindo células B totais ($CCR9^+ \alpha_4\beta_7^+$, $IL-10^+ IL-17^+$ e $IL-10^+ IL-17^-$), células transicionais ($HLA-DR^+ IgD^-$ e $CCR9^+ \alpha_4\beta_7^+$), células naïve ($CCR9^+ \alpha_4\beta_7^+$), células de memória $CD27^+ CD38^-$ ($IL-10^+ IL-17^+$ e $IL-10^+ IL-17^-$) e $CD27^- CD38^-$ ($CCR9^+ \alpha_4\beta_7^+$ e $IL-10^+ IL-17^+$). Em contrapartida, nas amostras dos pacientes com EM, foram verificadas correlações negativas entre os níveis plasmáticos de LBP com a presença de células transicionais, expressando elevados níveis de IL-10, e células naïve e de memória $CD27^+ CD38^-$ com elevado MFI da integrina $\alpha_4\beta_7$. Ainda, em EM, elevada frequência de células de memória $CD27^- CD38^- CCR9^+ \alpha_4\beta_7^+$ foi observada entre em pacientes que apresentam menores níveis de LBP. No grupo com NMOSD, correlações positivas entre níveis plasmáticos da LBP foram observadas com as células B totais, naïve e plasmablastos que expressam elevados níveis de CCR9. Ainda, LBP foi correlacionado positivamente, no grupo com NMOSD, com a frequência de células transicionais ($HLA-DR^+ IgD^+$ e $HLA-DR^+ IgD^-$), células naïve

(CCR9⁺α₄β₇⁻) e diferentes subtipos de memória (CD27⁺CD38⁺ e CD27⁻CD38⁻) CCR9⁺α₄β₇⁻. Em contraste, correlações negativas foram observadas para células naïve CCR9⁻α₄β₇⁺. Ao considerar a participação do eixo intestino-cérebro, observa-se que, em comparação com a EM, a gravidade da NMOSD poderia estar associada a uma correlação mais robusta entre a transmigração bacteriana — representada aqui pelos níveis plasmáticos de LBP — e subtipos mais ativados de linfócitos B (CCR9⁺ e HLA-DR⁺IgD⁻). No entanto, são necessários estudos adicionais para elucidar o papel das células que promovem o homing intestinal na EM e compreender de que forma essas células contribuem para a manutenção da homeostase nesses indivíduos.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, verificou-se uma maior porcentagem na frequência de células B transicionais HLA-DR⁺IgD⁺ em indivíduos saudáveis, em contraste com o aumento dessas células no subtipo HLA-DR⁺IgD⁻ nos grupos de pacientes com EM e NMOSD, sugerindo um possível desbalanço imunológico associado à perda da homeostase. No grupo NMOSD, células de memória CD27⁺CD38⁻HLA-DR⁺IgD⁻ mostraram correlação positiva com o grau de incapacidade dos pacientes, o que aponta para um papel desse subtipo como precursor potencial de plasmoblastos patogênicos. Além disso, a frequência de plasmoblastos, incluindo aqueles com fenótipo funcional CD138⁺, esteve aumentada em ambos os grupos, correlacionando-se positivamente com a pontuação na escala EDSS.

No que tange às células B com perfil de migração mucosa (CCR9⁺α₄β₇⁺), foram encontradas menores frequências em pacientes com EM e NMOSD em comparação a indivíduos saudáveis. Contudo, ao correlacionar esses fenótipos com a escala EDSS, observou-se que apenas algumas subpopulações CCR9⁺α₄β₇⁻ — como células B totais, plasmoblastos e células de memória CD27⁺CD38⁺ no grupo NMOSD — apresentaram correlação negativa com a incapacidade, comportamento análogo ao identificado em células de memória (CD27⁺CD38⁺ e CD27⁻CD38⁻) no grupo EM.

Em relação as citocinas avaliadas internamente via citometria de fluxo, notou-se uma redução significativa das células B produtoras de IL-10 nos indivíduos com NMOSD em relação aos pacientes com EM e aos controles saudáveis. Em contrapartida, células produtoras de IL-17, sobretudo do subtipo de memória CD27⁺CD38⁻, apresentaram aumento no grupo NMOSD. Em pacientes com NMOSD, as células de memória CD27⁺CD38⁻HLA-DR⁺IgD⁻ e CD27⁺CD38⁻IL-10⁺IL-17⁻ se correlacionaram positiva e negativamente com EDSS, respectivamente o que sugere que esse subtipo possa estar envolvido na amplificação do processo inflamatório, possivelmente por meio da diferenciação em plasmoblastos de longa vida produtores de IgG.

Por fim, em relação as correlações efetuadas entre os níveis plasmáticos de LBP e os grupos controle, EM e NMOSD, foi possível observar que, em

pacientes acometidos com EM, diversas subpopulações de células B, incluindo células B totais, transicionais, naïve e de memória com fenótipo CCR9⁺α₄β₇⁺ mostraram correlações positivas com LBP, contrapondo-se as correlações referentes ao grupo NMOSD, os quais apresentaram correlação positiva apenas quando o LBP foi associado a subtipos ativados de células B expressando os marcadores CCR9 e HLA-DR. Esses dados indicam perfis distintos de associação entre transmigração bacteriana e ativação de células B em controles e pacientes com doenças neuroinflamatórias.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA (ABN). Disponível em: <www.abneuro.org.br> Acesso em 26 de Julho de 2024

ACADEMIA BRASILEIRA DE NEUROLOGIA (ABN). Disponível em: <www.abneuro.org.br> Acesso em 26 de Julho de 2024.

ADAMS, R.D.; VICTOR, M. Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. In: Principles of Neurology. 4a ed. New York, **McGraw-Hill international editions**, p. 755- 774, 1998;

AGEMATSU K. Memory B cells and CD27. **Histol Histopathol**. 2000 Apr;15(2):573-6. doi: 10.14670/HH-15.573. PMID: 10809378.

AHLAWAT S, ASHA, SHARMA KK. Gut-organ axis: a microbial outreach and networking. **Lett Appl Microbiol**. 2021 Jun;72(6):636-668. doi: 10.1111/lam.13333. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32472555.

ALVES-LEON, S.V.; Malfetano, F.R.; PIMENTEL, M.L. ESTRADA, C.L.; PEREIRA, V.C.; LIEM, A.M.; NOVIS, S.A. Multiple sclerosis outcome and morbidity mortality of a Brazilian cohort of patients. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, 66: 671-677; 2008

AMERICAN ACADEMY OF NEUROLOGY (AAN). Disponível em:< www.aan.com> Acesso em 26 de Julho de 2024

AMOO M, O'HALLORAN PJ, HENRY J, BEN HUSIEN M, BRENNAN P, CAMPBELL M, CAIRD J, CURLEY GF. Permeability of the Blood-Brain Barrier after Traumatic Brain Injury: Radiological Considerations. **J Neurotrauma**. 2022 Jan;39(1-2):20-34. doi: 10.1089/neu.2020.7545. Epub 2021 Apr 12. PMID: 33632026.

ARGYRIOU, A. A.; MAKRIS, N. Neuromyelitis optica: a distinct demyelinating disease of the central nervous system. **Acta neurologica scandinavica**, v. 118, n. 4, p. 209-217, 2008.

ARMANGUE, Thaís *et al.* Associations of paediatric demyelinating and encephalitic syndromes with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a multicentre observational study. ***The Lancet Neurology***, v. 19, n. 3, p. 234-246, 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLEROSE MÚLTIPLA (ABEM). Disponível em: <www.abem.org.br> Acesso em 26 de Julho de 2024

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESCLEROSE MÚLTIPLA (ABEM). Disponível em: <www.abem.org.br> Acesso em 28 de Julho de 2024.

BANIAHMAD A, Birkner K, Görg J, Loos J, Zipp F, Wasser B, Bittner S. The frequency of follicular T helper cells differs in acute and chronic neuroinflammation. ***Sci Rep***. 2020 Nov 24;10(1):20485. doi: 10.1038/s41598-020-77588-9. PMID: 33235306; PMCID: PMC7686332.

BARZEGAR M, et al. Early predictors of conversion to secondary progressive multiple sclerosis. ***Multiple Sclerosis Related Disorders***. 2021; 54 (103):1-15.

BCTRIMS – COMITÊ BRASILEIRO DE TRATAMENTO E PESQUISA EM ESCLEROSE MÚLTIPLA. Disponível em: <www.bctrims.com.br> Acesso em 26 de Julho de 2024.

BCTRIMS – COMITÊ BRASILEIRO DE TRATAMENTO E PESQUISA EM ESCLEROSE MÚLTIPLA. Disponível em: <www.bctrims.com.br> Acesso em 26 de Julho de 2024

BERLIN, C., BARGATZE, R. F., CAMPBELL, J. J., VON ANDRIAN, U. H., SZABO, M. C., HASSLEN, S. R., NELSON, R. D., BERG, E. L., ERLANDSEN, S. L., & BUTCHER, E. C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. ***Cell***, 80(3), 413–422. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90491-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90491-3)

BHATIA R, Singh N. Can We Treat Secondary Progressive Multiple Sclerosis Now? *Ann Indian Acad Neurol*. 2019 Apr-Jun;22(2):131-136. doi: 10.4103/aian.AIAN_345_18. PMID: 31007422; PMCID: PMC6472227.

BLAIR, P. A., NOREÑA, L. Y., FLORES-BORJA, F., RAWLINGS, D. J., ISENBERG, D. A., EHRENSTEIN, M. R., & MAURI, C. (2010). CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 32(1), 129–140. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>

BOESEN, Magnus Spangsberg *et al*. Pediatric-onset multiple sclerosis and other acquired demyelinating syndromes of the central nervous system in Denmark during 1977–2015: a nationwide population-based incidence study. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 24, n. 8, p. 1077-1086, 2018.

BOLNICK DI, SNOWBERG LK, HIRSCH PE, LAUBER CL, ORG E, PARKS B, LUSIS AJ, KNIGHT R, CAPORASO JG, SVANBÄCK R. Individual diet has sex-dependent effects on vertebrate gut microbiota. *Nat Commun*. 2014 Jul 29;5:4500. doi: 10.1038/ncomms5500. PMID: 25072318; PMCID: PMC4279269.

BRADL, Monika; REINDL, Markus; LASSMANN, Hans. Mechanisms for lesion localization in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Current Opinion in Neurology*, v. 31, n. 3, p. 325, 2018.

BRANDSTADTER JD, MAILLARD I. Notch signalling in T cell homeostasis and differentiation. *Open Biol*. 2019 Nov 29;9(11):190187.

BROOKE, B. N., HOFFMANN, D. C., & SWARBRICK, E. T. (1969). Azathioprine for Crohn's disease. *Lancet* (London, England), 2(7621), 612–614. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(69\)90325-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(69)90325-0)

BROWNLEE, Wallace J. et al. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet*, v. 389, n. 10076, p. 1336-1346, 2017.

BRUCKLACHER-WALDERT, V.; STURNER, K.; KOLSTER, M., et al. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. **Brain**, 132: 3329–3341, 2009;

BURKETT, P. R., MEYER ZU HORSTE, G., & KUCHROO, V. K. (2015). Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. **The Journal of clinical investigation**, 125(6), 2211–2219. <https://doi.org/10.1172/JCI78085>

BUZZARD KA, Broadley SA, Butzkueven H. What Do Effective Treatments for Multiple Sclerosis Tell Us about the Molecular Mechanisms Involved in Pathogenesis? **International Journal of Molecular Sciences**. 2012; 13(10):12665-12709. <https://doi.org/10.3390/ijms131012665>

CAMARA-LEMARROY, C. R., METZ, L., MEDDINGS, J. B., SHARKEY, K. A., & WEE YONG, V. (2018). The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. **Brain : a journal of neurology**, 141(7), 1900–1916. <https://doi.org/10.1093/brain/awy131>

CANI PD, OSTO M, GEURTS L, EVERARD A. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity. **Gut Microbes**. 2012 Jul-Aug;3(4):279-88. doi: 10.4161/gmic.19625. Epub 2012 May 14. PMID: 22572877; PMCID: PMC3463487.

CARNERO CONTENTTI E, CORREALE J. Neuromyelitis optica spectrum disorders: from pathophysiology to therapeutic strategies. **J Neuroinflammation**. 2021 Sep 16;18(1):208. doi: 10.1186/s12974-021-02249-1. PMID: 34530847; PMCID: PMC8444436.

CARTER NA, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **Journal of Immunology**. 2011; 186(10): 69-79.

CARTER NA, et al. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. **Journal of Immunology**. 2011; 186(10): 69-79.

CENCIONI MT, MATTOSCO M, MAGLIOZZI R, BAR-OR A, MURARO PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. **Nat Rev Neurol**. 2021 Jul;17(7):399-414.

CHANG X, JIAO K, WANG D, ZHOU Y, ZHAO Z, XING Y, ZHANGBAO J, LU C, WANG J, QUAN C. The immune imbalance between follicular regulatory and helper T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein IgG-associated disease. **Clin Immunol**. 2023 Oct;255:109734. doi: 10.1016/j.clim.2023.109734. Epub 2023 Aug 11. PMID: 37572951.

CHEN, Ding *et al*. Inebilizumab, a B cell-depleting anti-CD19 antibody for the treatment of autoimmune neurological diseases: insights from preclinical studies. **Journal of clinical medicine**, v. 5, n. 12, p. 107, 2016.

CHOILEÁIN SN, KLEINewietfeld M, RADDASSI K, HAFLER DA, RUFF WE, LONGBRAKE EE. CXCR3+ T cells in multiple sclerosis correlate with reduced diversity of the gut microbiome. **J Transl Autoimmun**. 2019 Dec 20;3:100032. doi: 10.1016/j.jtauto.2019.100032. PMID: 32743517; PMCID: PMC7388357.

CHUNG, M. K. Y. et al. Functions of double-negative B cells in autoimmune diseases, infections, and cancers. *EMBO Molecular Medicine*, [S. l.], v. 15, n. 9, p. e17341, 11 set. 2023. DOI: 10.15252/emmm.202217341. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/emmm.202217341>. Acesso em: 30 jul. 2025.

CLAES N., DHAEZE T., FRAUSSEN J., BROUX B., VAN WIJMEERSCH B., STINISSEN P., HUPPERTS R., HELLINGS N., SOMERS V. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: A 12-month follow-up study. **PLoS ONE**. 2014; 9:111-115.

CLAES N., DHAEZE T., FRAUSSEN J., BROUX B., VAN WIJMEERSCH B., STINISSEN P., HUPPERTS R., HELLINGS N., SOMERS V. Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: A 12-month follow-up study. **PLoS ONE**. 2014; 9:111-115.

CODARRI, Laura *et al.* RORYt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. **Nature immunology**, v. 12, n. 6, p. 560-567, 2011.

COMI G, Bar-Or A, Lassmann H, et al. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. **Ann Neurol**. 2021;89(1):13-23. doi:10.1002/ana.25927

COMINI-FROTA, E. R; VASCONCELOS C.F.C; MENDES M.F. Guideline for multiple sclerosis treatment in Brazil: Consensus from the Neuroimmunology Scientific Department of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq. Neuro-Psiquiatr**. 75(1). Jan. 2017

CORTESE R, PRADOS CARRASCO F, TUR C, BIANCHI A, BROWNLEE W, DE ANGELIS F, DE LA PAZ I, GRUSSU F, HAIDER L, JACOB A, KANBER B, MAGNOLLAY L, NICHOLAS RS, TRIP A, YIANNAKAS M, TOOSY AT, HACHOEN Y, BARKHOF F, CICCARELLI O. Differentiating Multiple Sclerosis from AQP4-Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder and MOG-Antibody Disease with Imaging. **Neurology**. 2023 Jan 17;100(3):e308-e323. doi: 10.1212/WNL.0000000000201465. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36192175; PMCID: PMC9869760.

COSSBURN, Mark *et al.* The prevalence of neuromyelitis optica in South East Wales. **European journal of neurology**, v. 19, n. 4, p. 655-659, 2012.

COTZOMI, E., STATHOPOULOS, P., LEE, C. S., RITCHIE, A. M., SOLTYS, J. N., DELMOTTE, F. R., OE, T., SNG, J., JIANG, R., MA, A. K., VANDER HEIDEN, J. A., KLEINSTEIN, S. H., LEVY, M., BENNETT, J. L., MEFFRE, E., & O'CONNOR, K. C. (2019). Early B cell tolerance defects in neuromyelitis optica favour anti-AQP4 autoantibody production. **Brain : a journal of neurology**, 142(6), 1598–1615. <https://doi.org/10.1093/brain/awz106>

CRANE, Jonathan M. *et al.* Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 18, p. 16516-16524, 2011.

CRESCI GA, BAWDEN E. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. **Nutr Clin Pract**. 2015 Dec;30(6):734-46. doi: 10.1177/0884533615609899. Epub 2015 Oct 8. PMID: 26449893; PMCID: PMC4838018.

CRYAN JF, O'RIORDAN KJ, COWAN CSM, SANDHU KV, BASTIAANSSEN TFS, BOEHME M, CODAGNONE MG, CUSSOTTO S, FULLING C, GOLUBEVA AV, GUZZETTA KE, JAGGAR M, LONG-SMITH CM, LYTE JM, MARTIN JA, MOLINERO-PEREZ A, MOLONEY G, MORELLI E, MORILLAS E, O'CONNOR R, CRUZ-PEREIRA JS, PETERSON VL, REA K, RITZ NL, SHERWIN E, SSPICHAK S, TEICHMAN EM, VAN DE WOUW M, VENTURA-SILVA AP, WALLACE-FITZSIMONS SE, HYLAND N, CLARK G, DINAN TG. The Microbiota-Gut-Brain Axis. **Physiol Rev**. 2019 Oct 1;99(4):1877-2013. doi: 10.1152/physrev.00018.2018. PMID: 31460832.

DA SILVA, M. da G. L. et al. Doenças Desmielinizantes do Sistema Nervoso Central: estado da arte baseado em uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Case Reports**, v. 2, n. 3, p. 136-147, 2022.

DARGAHI, N., KATSARA, M., TSELIOS, T., ANDROUTSOU, M. E., DE COURTEN, M., MATSOUKAS, J., APOSTOLOPOULOS, V. Multiple sclerosis: Immunopathology and treatment update. **Brain Sciences**, 7(7), 1–27. 2017

DECK, N.; LEE, W.; BERNEMAN, Z.N.; COOLS, N. (2013). Neuroendocrine Immunoregulation in Multiple Sclerosis. **Clinical and Developmental Immunology**. 1-23; 2013

DEMA M, et al. Immunosenescence in multiple sclerosis: the identification of new therapeutic targets. **Autoimmunity Reviews**. 202; 20(9): 28 - 93.

DERDELINCKX J, Reynders T, Wens I, Cools N, Willekens B. Cells to the Rescue: Emerging Cell-Based Treatment Approaches for NMOSD and MOGAD. **International Journal of Molecular Sciences**. 2021; 22(15):7925. <https://doi.org/10.3390/ijms22157925>

DIAS ASO, SACRAMENTO PM, LOPES LM, SALES MC, CASTRO C, ARAÚJO ACRA, ORNELAS AMM, AGUIAR RS, SILVA-FILHO RG, ALVARENGA R,

BENTO CAM. TLR-2 and TLR-4 agonists favor expansion of CD4⁺ T cell subsets implicated in the severity of neuromyelitis optica spectrum disorders. **Mult Scler Relat Disord**. 2019 Sep;34:66-76. doi: 10.1016/j.msard.2019.06.018. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31229737.

DIEBOLDER, Christoph A. *et al*. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. **Science**, v. 343, n. 6176, p. 1260-1263, 2014.

DISANTO G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. **Neurology**. 2012;78(11):823-832. doi:10.1212/WNL.0b013e318249f6f0

DISANTO G, MORAHAN JM, BARNETT MH, GIOVANNONI G, RAMAGOPALAN SV. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. **Neurology**. 2012;78(11): 823–32. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f6f0>.

DUAN Y, ZHUO Z, LI H, et al. Brain structural alterations in MOG antibody diseases: a comparative study with AQP4 seropositive NMOSD and MS. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2021;92(7):709-716.

DUBINSKI P, CZARZASTA K, CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA A. The Influence of Gut Microbiota on the Cardiovascular System Under Conditions of Obesity and Chronic Stress. **Curr Hypertens Rep**. 2021 May 20;23(5):31. doi: 10.1007/s11906-021-01144-7. PMID: 34014393; PMCID: PMC8137478.

DWYER CM, Nguyen LT, Healy LM, Dutta R, Ludwin S, Antel J, Binder MD, Kilpatrick TJ. Multiple Sclerosis as a Syndrome-Implications for Future Management. **Front Neurol**. 2020 Aug 28;11:784. doi: 10.3389/fneur.2020.00784. PMID: 32982904; PMCID: PMC7483755.

DYMENT D. A., EBERS GC, SADOVNICK AD. Genetics of multiple sclerosis. **Lancet Neurol**. 3:104-10. 2004.

EL FASSI D, NIELSEN C, KJELDSEN J, CLEMMENSEN O, HEGEDUS L. Ulcerative colitis following B lymphocyte depletion with rituximab in a patient with graves' disease. **Gut**. 2008;57:714–5.

ELSONE, Liene *et al.* Role of intravenous immunoglobulin in the treatment of acute relapses of neuromyelitis optica: experience in 10 patients. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 4, p. 501-504, 2014.

FAN X, JIANG Y, HAN J, LIU J, WEI Y, JIANG X, JIN T. Circulating Memory T Follicular Helper Cells in Patients with Neuromyelitis Optica/Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. **Mediators Inflamm.** 2016;2016:3678152. doi: 10.1155/2016/3678152. Epub 2016 Mar 9. PMID: 27057097; PMCID: PMC4804098.

FERREIRA TB, HYGINO J, WING AC, KASAHARA TM, SACRAMENTO PM, CAMARGO S, RUEDA F, ALVES-LEON SV, ALVARENGA R, VASCONCELOS CC, AGRAWAL A, GUPTA S, BENTO CAM. Different interleukin-17-secreting Toll-like receptor⁺ T-cell subsets are associated with disease activity in multiple sclerosis. **Immunology.** 2018 Jun;154(2):239-252. doi: 10.1111/imm.12872. Epub 2017 Dec 26. PMID: 29168181; PMCID: PMC6381308.

FILIPPI M, PREZIOSA P, BANWELL BL, *et al.* Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. **Brain.** 2019;142(7):1858-1875.

FLANAGAN, Eoin P. *et al.* Epidemiology of aquaporin-4 autoimmunity and neuromyelitis optica spectrum. **Annals of neurology**, v. 79, n. 5, p. 775-783, 2016.

FLORES-BORJA, F., BOSMA, A., NG, D., REDDY, V., EHRENSTEIN, M. R., ISENBERG, D. A., & MAURI, C. (2013). CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. **Science translational medicine**, 5(173), 173ra23. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005407>

FUJIHARA, Kazuo *et al.* Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 3, n. 2, p. 58-73, 2012.

GAFSON, A., GIOVANNONI, G., & HAWKES, C. H. The diagnostic criteria for multiple sclerosis: From Charcot to McDonald. ***Multiple Sclerosis and Related Disorders***, 9 – 14. 2012.

GIOVANNONI, G. Disease-modifying treatments for early and advanced multiple sclerosis : a new treatment paradigm. 2018.

GOLD SM, Willing A, Leypoldt F, Paul F, Friese MA. Sex differences in autoimmune disorders of the central nervous system. ***Semin Immunopathol.*** (2019) 41:177–88. doi: 10.1007/s00281-018-0723-8

GRUTZKE B., HUCKE S., GROSS C.C., HEROLD M.V., POSEVITZ-FEJFAR A., WILDEMANN B.T., KIESEIER B.C., DEHMEL T., WIENDL H., KLOTZ L. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Annals of Clinical. **Translational Neurology***. 2015; 2:119–130.

GRUTZKE B., HUCKE S., GROSS C.C., HEROLD M.V., POSEVITZ-FEJFAR A., WILDEMANN B.T., KIESEIER B.C., DEHMEL T., WIENDL H., KLOTZI L. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. ***Annals of Clinical. Translational Neurology***. 2015; 2:119–130.

GUTZEIT C, CHEN K, CERUTTI A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. ***Eur J Immunol.*** 2018 Jul;48(7):1101-1113.

GUTZEIT C, CHEN K, CERUTTI A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. *European Journal of Immunology*. 2018 48(7):1101-1113.

GUTZEIT C, CHEN K, CERUTTI A. The enigmatic function of IgD: some answers at last. ***European Journal of Immunology***. 2018 48(7):1101-1113.

GWAK MG, CHANG SY. Gut-Brain Connection: Microbiome, Gut Barrier, and Environmental Sensors. ***Immune Netw.*** 2021 Jun 16;21(3):e20. doi: 10.4110/in.2021.21.e20. PMID: 34277110; PMCID: PMC8263213.

HINSON, Shannon R. *et al.* Aquaporin-4–binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. ***The Journal of experimental medicine***, v. 205, n. 11, p. 2473-2481, 2008.

HINSON, Shannon. R. *et al.* Molecular outcomes of neuromyelitis optica (NMO)-IgG binding to aquaporin-4 in astrocytes. ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, v. 109, n. 4, p. 1245-1250, 2012.

HINSON, Shannon. R. *et al.* Pathogenic potential of IgG binding to water channel extracellular domain in neuromyelitis optica. ***Neurology***, v. 69, n. 24, p. 2221–2231, 2007.

HÖFTBERGER, Romana *et al.* Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease. ***Multiple Sclerosis Journal***, v. 21, n. 7, p. 866-874, 2015.

HÖFTBERGER, Romana *et al.* The pathology of central nervous system inflammatory demyelinating disease accompanying myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantibody. ***Acta neuropathologica***, v. 139, p. 875-892, 2020.

HOOPER LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. ***Science***. 2012 Jun 8;336(6086):1268-73. doi: 10.1126/science.1223490. Epub 2012 Jun 6. PMID: 22674334; PMCID: PMC4420145.

HOWE, Charles L *et al.* Neuromyelitis optica IgG stimulates an immunological response in rat astrocyte cultures. ***Glia***, v. 62, n. 5, p. 692-708, 2014.

HUDA S, Whittam D, Bhojak M, Chamberlain J, Noonan C, Jacob A. Neuromyelitis optica spectrum disorders. ***Clin Med (Lond)***. 2019;19(2):169-176. doi:10.7861/clinmedicine.19-2-169

HYGINO J, SALES MC, SACRAMENTO PM, KASAHARA TM, DA SILVA JCC, BILHÃO R, ANDRADE RM, VASCONCELOS CCF, BENTO CAM. Hyperresponsiveness of Corticoid-Resistant Th17/Tc-17 Cells to TLR-2 and TLR-4 Ligands is a Feature of Multiple Sclerosis Patients at Higher Risk of Therapy Failure. ***J Inflamm Res***. 2024 Nov 14;17:8775-8797. doi: 10.2147/JIR.S476110. PMID: 39564547; PMCID: PMC11573880

IEBBA V, TOTINO V, GAGLIARDI A, SANTANGELO F, CACCIOTTI F, TRANCASSINI M, MANCINI C, CICERONE C, CORAZZIARI E, PANTANELLA F, SCHIPPA S. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiol.** 2016 Jan;39(1):1-12. PMID: 26922981.

IVANOV II, ATARASHI K, MANEL N, BRODIE EL, SHIMA T, KARAOZ U, WEI D, GOLDFARB KC, SANTEE CA, LYNCH SV, TANOUE T, IMAOKA A, ITOH K, TAKEDA K, UMESAKI Y, HONDA K, LITTMAN DR. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. **Cell.** 2009 Oct 30;139(3):485-98. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033. PMID: 19836068; PMCID: PMC2796826.

JACOB, Anu *et al.* Treatment of neuromyelitis optica with rituximab. **Arch Neurol**, v. 65, n.11, p. 1443-8, 2008.

JANSSEN M, BRUIJSTENS AL, VAN LANGELAAR J, WONG Y, WIERENGA-WOLF AF, MELIEF MJ, RIJVERS L, VAN PELT ED, SMOLDERS J, WOKKE BH, VAN LUIJN MM. Naive B cells in neuromyelitis optica spectrum disorders: impact of steroid use and relapses. **Brain Commun.** 2020 Nov 16;2(2):fcaa197. doi: 10.1093/braincomms/fcaa197. PMID: 33305266; PMCID: PMC7714275.

JARIUS, S. *et al.* Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. **Brain a Journal of Neurology**, v. 131, n. 11, p. 3072-3080, Nov 2008.

JARIUS, S.; WILDEMANN, B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. Nature reviews. **Neurology**, v. 6, n. 7, p. 383–92, jul. 2010.

JENKS SA, CASHMAN KS, ZUMAQUERO E, MARIGORTA UM, PATEL AV, WANG X, et al. Distinct effector B cells induced by unregulated toll like receptor 7 contribute to pathogenic responses in systemic lupus erythematosus. **Immunity.** (2018) 49:725– 39.e6.

JONES GW, Jones SA. Ectopic lymphoid follicles: inducible centres for generating antigen-specific immune responses within tissues. **Immunology.** 2016 Feb;147(2):141-51.

KADOWAKI, A., SAGA, R., LIN, Y., SATO, W., & YAMAMURA, T. (2019). Gut microbiota-dependent CCR9+CD4+ T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. ***Brain : a journal of neurology***, 142(4), 916–931. <https://doi.org/10.1093/brain/awz012>

KAPPOS, L., LI, D., CALABRESI, P. A., O'CONNOR, P., BAR-OR, A., BARKHOF, F., YIN, M., LEPPERT, D., GLANZMAN, R., TINBERGEN, J., & HAUSER, S. L. (2011). Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. ***Lancet (London, England)***, 378(9805), 1779–1787. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61649-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61649-8)

KARABUDAK R, DAHDALEH M, ALJUMAH M, ALROUGHANI R, ALSHAROQI IA, ALTAHAN AM, BOHLEGA SA, DAIF A, DELEU D, AMOUS A, INSHASI JS, RIECHMANN P, SAHRAIAN MA, YAMOUT BI. Functional clinical outcomes in multiple sclerosis: Current status and future prospects. ***Mult Scler Relat Disord***. 2015 May;4(3):192-201. doi: 10.1016/j.msard.2015.03.004. Epub 2015 Mar 23. PMID: 26008936.

KASARELLO K, CUDNOCH-JEDRZEJEWSKA A, CZARZASTA K. Communication of gut microbiota and brain *via* immune and neuroendocrine signaling. ***Front Microbiol***. 2023 Jan 25;14:1118529. doi: 10.3389/fmicb.2023.1118529. PMID: 36760508; PMCID: PMC9907780.

KAY CSK, SCOLA RH, ARNDT RC, LORENZONI PJ, WERNECK LC. HLA-alleles class I and II associated with genetic susceptibility to neuromyelitis optica in Brazilian patients. ***Arq Neuropsiquiatr***. 2019;77(4):239-247. doi:10.1590/0004-282X20190031.

KEBIR H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. ***Annals of Neurology Ann. Neurol***. 2009; 66:390–402.

KESSLER, Remi A.; MEALY, Maureen A.; LEVY, Michael. Treatment of neuromyelitis optica spectrum disorder: acute, preventive, and symptomatic. ***Current treatment options in neurology***, v. 18, p. 1-15, 2016.

KHAN, A.W.; FAROOQ, M.; HWANG, M.-J.; HASEEB, M.; CHOI, S. Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 7960. <https://doi.org/10.3390/ijms24097960>

KIM HJ, PAUL F, LANA-PEIXOTO MA, et al; Guthy-Jackson Charitable Foundation NMO International Clinical Consortium & Biorepository. MRI characteristics of neuromyelitis optica spectrum disorder: an international update. *Neurology*. 2015;84(11):1165-1173.

KIMBROUGH, Dorlan J. et al. Treatment of neuromyelitis optica: review and recommendations. *Multiple sclerosis and related disorders*, v. 1, n. 4, p. 180-187, 2012.

KINGWELL, Elaine et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC neurology*, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2013.

KITLEY J, Waters P, Woodhall M, Leite MI, Murchison A, George J, et al. Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study. *JAMA Neurol.* (2014) 71:276–83. doi: 10.1001/jamaneurol.2013. 5857

KOBELT G, TEICH V, CAVALCANTI M, CANZONIERI AM. Burden and cost of multiple in Brazil. *PLoS One*. 2019 Jan 23;14(1)

KORN T, MITSDOERFFER M, CROXFORD A, AWASTHI A, DARDALHON V, GALILEOS G, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:18460–5.

KOUTSOUNAS, I., KAL TSA, G., SIAKAVELLAS, S. I., & BAMIAS, G. (2015). Markers of bacterial translocation in end-stage liver disease. *World journal of hepatology*, 7(20), 2264–2273. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i20.2264>

KOVACS A, BEN-JACOB N, TAYEM H, HALPERIN E, IRAQUI FA, GOPHNA U. Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota. *Microb Ecol*. 2011 Feb;61(2):423-8. doi: 10.1007/s00248-010-9787-2. Epub 2010 Dec 23. PMID: 21181142.

KOWARICK MC, CEPOK S, SELLNER J, GRUMMEL V, WEBER S, KORN T, et al. CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. **J Neuroinflammation**. 2012;9:93.

KOWARIK, M. C., ASTLING, D., GASPERI, C., WEMLINGER, S., SCHUMANN, H., DZIECIATKOWSKA, M., RITCHIE, A. M., HEMMER, B., OWENS, G. P., & BENNETT, J. L. (2017). CNS Aquaporin-4-specific B cells connect with multiple B-cell compartments in neuromyelitis optica spectrum disorder. **Annals of clinical and translational neurology**, 4(6), 369–380. <https://doi.org/10.1002/acn3.418>

KUMAR G, AXTELL RC. Dual Role of B Cells in Multiple Sclerosis. **Int J Mol Sci**. 2023 Jan 25;24(3):2336. doi: 10.3390/ijms24032336. PMID: 36768658; PMCID: PMC9916779.

KÜMPFEL T, GIGLHUBER K, AKTAS O, AYZENBERG I, BELLMANN-Strobl J, HÄUBLER V, HAVLA J, HELLWIG K, HÜMMERT MW, JARIUS S, KLEITER I, KLOTZ L, KRUMBHOLZ M, PAUL F, RINGELSTEIN M, RUPRECHT K, SENEL M, STELLMANN JP, BERGH FT, TREBST C, TUMANI H, WARNKE C, WILDEMANN B, BERTHELE A; Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). **Part II: Attack therapy and long-term management. J Neurol**. 2024 Jan;271(1):141-176. doi: 10.1007/s00415-023-11910-z. Epub 2023 Sep 7. Erratum in: J Neurol. 2024 Jun;271(6):3702-3707. doi: 10.1007/s00415-024-12288-2. PMID: 37676297; PMCID: PMC10770020.

KUNCHOK, Amy *et al*. Coexistence of myelin oligodendrocyte glycoprotein and aquaporin-4 antibodies in adult and pediatric patients. **JAMA neurology**, v. 77, n. 2, p. 257-259, 2020.

KURTZKE JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**. 1983;33(11):1444-1452. doi:10.1212/wnl.33.11.1444

LARSEN JM. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. **Immunology**. 2017 Aug;151(4):363-374. doi: 10.1111/imm.12760. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28542929; PMCID: PMC5506432.

LATHROP SK, BLOOM SM, RAO SM, NUTSCH K, LIO CW, SANTACRUZ N, PETERSON DA, STAPPENBECK TS, HSIEH CS. Peripheral education of the immune system by colonic commensal microbiota. **Nature**. 2011 Sep 21;478(7368):250-4. doi: 10.1038/nature10434. PMID: 21937990; PMCID: PMC3192908.

LERNER A, NEIDHÖFER S, MATTHIAS T. The Gut Microbiome Feelings of the **Brain: A Perspective for Non-Microbiologists**. Microorganisms. 2017 Oct 12;5(4):66. doi: 10.3390/microorganisms5040066. PMID: 29023380; PMCID: PMC5748575.

LEVIN, A.B.; HADGKISS, E.J.; WEILAND, T.J.; JELINEK, G.J. Meditation as an Adjunct to the Management of Multiple Sclerosis. **Neurology Research International**. 2014

LEVY, Michael; MEALY, Maureen A. B-Cell Targeted Treatments for Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder: A Focus on CD19 and CD20. **ImmunoTargets and Therapy**, p. 325-331, 2021.

LIEBREGTS, T., ADAM, B., BREDACK, C., GURURATSAKUL, M., PILKINGTON, K. R., BRIERLEY, S. M., BLACKSHAW, L. A., GERKEN, G., TALLEY, N. J., & HOLTSMANN, G. Small bowel homing T cells are associated with symptoms and delayed gastric emptying in functional dyspepsia. **The American journal of gastroenterology**, 106(6), 1089–1098. <https://doi.org/10.1038/ajg.2010.512>

LI R, PATTERSON KR, BAR-OR A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. **Nat Immunol**. 2018 Jul;19(7):696-707.

LI R., REZKA., GHADIRI M., LUESSI F., ZIPP F., LI H., GIACOMINI P.S., ANTEL J., BAR-OR A. Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory

Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. ***Journal of Immunology***. 2017; 198:691–698

LI R., REZKA., GHADIRI M., LUESSI F., ZIPP F., LI H., GIACOMINI P.S., ANTEL J., BAR-OR A. Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. ***Journal of Immunology***. 2017; 198:691–698

LI, R. et al. Proinflammatory GM- CSF-producing B cell in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. ***Sci. Transl. Med.*** 7, 310ra166 (2015).

LI, Y., SHENG, L., JENA, P. K., GILBERT, M. C., WAN, Y.-J. Y., & MAO, H. (2022). Retinoic Acid Signaling Is Compromised in DSS-Induced Dysbiosis. ***Nutrients***, 14(14), 2788. <https://doi.org/10.3390/nu14142788>

LIDDELOW SA, BARRES BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. ***Immunity***. 2017 Jun 20;46(6):957-967.

LIU ZM, WANG KP, MA J, GUO ZHENG S. The role of all-trans retinoic acid in the biology of Foxp3+ regulatory T cells. ***Cell Mol Immunol***. 2015 Sep;12(5):553-7. doi: 10.1038/cmi.2014.133. Epub 2015 Feb 2. PMID: 25640656; PMCID: PMC4579645.

LOBIONDA S, SITTIPO P, KWON HY, LEE YK. The Role of Gut Microbiota in Intestinal Inflammation with Respect to Diet and Extrinsic Stressors. ***Microorganisms***. 2019 Aug 19;7(8):271. doi: 10.3390/microorganisms7080271. PMID: 31430948; PMCID: PMC6722800.

LOCK C, HERMANS G, PEDOTTI R, et al. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. ***Nat. Med.*** 8: 500–508. 2002

LOPEZ JA, DENKOVA M, RAMANATHAN S, DALE RC, BRILOT F. Pathogenesis of autoimmune demyelination: from multiple sclerosis to neuromyelitis optica spectrum disorders and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. ***Clin Transl Immunology***. 2021 Jul

26;10(7):e1316. doi: 10.1002/cti2.1316. PMID: 34336206; PMCID: PMC8312887.

LOPEZ JA, DENKOVA M, RAMANATHAN S, DALE RC, BRILOT F. Pathogenesis of autoimmune demyelination: from multiple sclerosis to neuromyelitis optica spectrum disorders and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease. **Clin Transl Immunology**. 2021 Jul 26;10(7):e1316. doi: 10.1002/cti2.1316. PMID: 34336206; PMCID: PMC8312887.

LORD JD, SHOWS DM. Thiopurine use associated with reduced B and natural killer cells in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**. 2017 May 14;23(18):3240-3251. doi: 10.3748/wjg.v23.i18.3240. PMID: 28566883; PMCID: PMC5434429.

LOVE, Seth. Demyelinating diseases. **Journal of clinical pathology**, v. 59, n. 11, p. 1151- 1159, 2006.

LOVETT-RACKE A. E., YANG Y., RACKE M. K. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? **Biochem. Biophys. Acta**. 1812: 246–251. 2011

LUNDY SK, WU Q, WANG Q, DOWLING CA, TAITANO SH, MAO G, MAO-DRAAYER Y. Dimethyl fumarate treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis influences B-cell subsets. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**. 2016 Mar 3;3(2):e211. doi: 10.1212/NXI.0000000000000211. PMID: 27006972; PMCID: PMC4784801.

LUU M, STEINHOFF U, VISEKRUNA A. Functional heterogeneity of gut-resident regulatory T cells. **Clin Transl Immunology**. 2017 Sep 22;6(9):e156. doi: 10.1038/cti.2017.39. PMID: 28983404; PMCID: PMC5628268.

MA S, et al . B Cell Dysfunction Associated With Aging and Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**. 2019; 27(10):318.

MA S, et al . B Cell Dysfunction Associated with Aging and Autoimmune Diseases. **Frontiers in Immunology**. 2019; 27(10):318.

MAGLIOZZI R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. **Brain**. 2007;130(Pt 4):1089-1104. doi:10.1093/brain/awm038

MAGLIOZZI R, HOWELL OW, NICHOLAS R, CRUCIANI C, CASTELLARO M, ROMUALDI C, ROSSI S, PITTERI M, BENEDETTI MD, GAJOFATTO A, PIZZINI FB, MONTEMEZZI S, RASIA S, CAPRA R, BERTOLDO A, FACCHIANO F, MONACO S, REYNOLDS R, CALABRESE M. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. **Ann Neurol**. 2018 Apr;83(4):739-755.

MAHAD, D. H., TRAPP, B. D., & LASSMANN, H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14(2), 183–193. 2015
Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- β -dependent immunosuppressive activity? **Trends Mol Med**. 2012;18(12):742–749.

MATSUSHITA T, YANABA K, BOUAZIZ JD, FUJIMOTO M, TEDDER TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **Journal of Clinical Investigation**. 2008; 118(10): 20-30.

MATSUSHITA T, YANABA K, BOUAZIZ JD, FUJIMOTO M, TEDDER TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. **Journal of Clinical Investigation**. 2008; 118(10): 20-30.

MATTHEWS L, MARASCO R, JENKINSON M, et al. Distinction of seropositive NMO spectrum disorder and MS brain lesion distribution. **Neurology**. 2013;80(14):1330-1337.

MATUSEVICIUS D., KIVISAKK P., BE H., et al. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. **Mult. Scler**. 5: 101–104. 1999.

MATUTE-BLANCH C, Villar LM, Álvarez-Cermeño JC, et al. Neurofilament light chain and oligoclonal bands are prognostic biomarkers in radiologically isolated syndrome. **Brain**. 2018;141(4):1085-1093. doi:10.1093/brain/awy021

MCCARRON MJ, PARK PW, FOOKSMAN DR. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. **Blood**. 2017; 129(20):2749-2759.

MCCARRON MJ, PARK PW, FOOKSMAN DR. CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. **Blood**. 2017; 129(20):2749-2759.

MCCARRON, M. J., PARK, P. W., & FOOKSMAN, D. R. (2017). CD138 mediates selection of mature plasma cells by regulating their survival. **Blood**, 129(20), 2749–2759. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-01-761643>

MCCUSKER RH, KELLEY KW. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **J Exp Biol**. 2013 Jan 1;216(Pt 1):84-98. doi: 10.1242/jeb.073411. PMID: 23225871; PMCID: PMC3515033.

MCDONALD, John W. *et al*. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. **Nature Medicine**, v. 4, n. 3, p. 291–7, mar. 1998.

MCFARLIN, D. E.; MCFARLAND, H. F. Multiple Sclerosis (First of Two Parts). **New England Journal of Medicine**, v. 307, n. 19, p. 1183–1188, 1982.

MEALY, Maureen A. *et al*. Epidemiology of neuromyelitis optica in the United States: a multicenter analysis. **Archives of neurology**, v. 69, n. 9, p. 1176-1180, 2012.

MEI, H. E. *et al*. Blood-borne human plasma cells in steady state are derived from mucosal immune responses. **Blood**, Baltimore, v. 113, n. 11, p. 2461–2469, 12 mar. 2009. DOI: 10.1182/blood-2008-04-153544.

MENARD LC, HABTE S, GONSIOREK W, LEE D, BANAS D, HOLLOWAY DA, *et al*. B cells from African American lupus patients exhibit an activated phenotype. **JCI Insight**. 2016; 16;1(9): 87310.

MENARD LC, HABTE S, GONSIOREK W, LEE D, BANAS D, HOLLOWAY DA, et al. B cells from African American lupus patients exhibit an activated phenotype. *JCI Insight*. 2016; 16;1(9): 87310.

MILOVANOVIC, J., ARSENIJEVIC, A., STOJANOVIC, B., KANJEVAC, T., ARSENIJEVIC, D., RADOSAVLJEVIC, G., MILOVANOVIC, M., & ARSENIJEVIC, N. (2020). Interleukin-17 in Chronic Inflammatory Neurological Diseases. *Frontiers in immunology*, 11, 947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00947>

MISU, T. et al. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain*, v. 130, n. 5, p. 1224–1234, 2 abr. 2007.

MISU, T. et al. Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta neuropathologica*, v. 125, n. 6, p. 815-827, 2013.

MITTRÜCKER, Hans-Willi; VISEKRUNA, Alexander; HUBER, Magdalena. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 62, p. 449-458, 2014.

MIYAMOTO, Katsuichi et al. Nationwide epidemiological study of neuromyelitis optica in Japan. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, v. 89, n. 6, p. 667-668, 2018.

MIYAZAKI, Y. et al. Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod , based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clinical Immunology*, v. 151, n. 2, p. 127–135, 2014.

MÖRBE UM, Jørgensen PB, Fenton TM, et al. Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol*. 2021;14(4):793-802. doi:10.1038/s41385-021-00389-4

MORA JR, VON ANDRIAN UH. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. **Seminars in Immunology**. 2009 Feb;21(1):28-35. DOI: 10.1016/j.smim.2008.08.002. PMID: 18804386; PMCID: PMC2663412.

MORO-SIBILOT L, THIS S, BLANC P, SANLAVILLE A, SISIRAK V, BARDEL E, BOSCHETTI G, BENDRISS-VERMARE N, DEFRANCE T, DUBOIS B, KAISERLIAN D. Plasmacytoid dendritic cells are dispensable for noninfectious intestinal IgA responses in vivo. **Eur J Immunol**. 2016 Feb;46(2):354-9. doi: 10.1002/eji.201545977. Epub 2015 Nov 23. PMID: 26518732.

MOSELEY CE, VIRUPAKSHIAH A, FORSTHUBER TG, STEINMAN L, WAUBANT E, ZAMVIL SS. MOG CNS Autoimmunity and MOGAD. **Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm**. 2024 Sep;11(5):e200275. doi: 10.1212/NXI.0000000000200275. Epub 2024 Jul 12. PMID: 38996203; PMCID: PMC11256982.

MOUAT IC, GOLDBERG E, HORWITZ MS. Age-associated B cells in autoimmune diseases. **Cellular and Molecular Life Science**. 2022; 79(8):402.

Mousa WK, Chehadeh F, Husband S. Microbial dysbiosis in the gut drives systemic autoimmune diseases. *Front Immunol*. 2022 Oct 20;13:906258. doi: 10.3389/fimmu.2022.906258. PMID: 36341463; PMCID: PMC9632986.

MOUSA WK, CHEHADEH F, HUSBAND S. Microbial dysbiosis in the gut drives systemic autoimmune diseases. **Front Immunol**. 2022 Oct 20;13:906258. doi: 10.3389/fimmu.2022.906258. PMID: 36341463; PMCID: PMC9632986.

MULTIPLE SCLEROSIS INTERNATIONAL FEDERATION (MSIF). Disponível em: <www.msif.org> Acesso em 26 de Julho de 2024

NAGELHUS, Erlend A.; OTTERSEN, Ole P. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. **Physiological reviews**, v. 93, n. 4, p. 1543-1562, 2013.

NAVE, Klaus-Armin; WERNER, Hauke B. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, p. 503- 533, 2014.

NEGRON, A. et al. The role of B cells in multiple sclerosis : Current and future therapies. **Cellular Immunology**, v. 339, n. September 2018, p. 10–23, 2019.

NEGRON, A. et al. The role of B cells in multiple sclerosis : Current and future therapies. **Cellular Immunology**, v. 339, n. September 2018, p. 10–23, 2019

NEGRON, A. et al. The role of B cells in multiple sclerosis : Current and future therapies. **Cellular Immunology**, v. 339, n. September 2018, p. 10–23, 2019

NIE, Tina; BLAIR, Hannah A. Inebilizumab: A Review in Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder. **CNS drugs**, v. 36, n. 10, p. 1133-1141, 2022.

NIELSEN, Søren *et al.* Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 171-180, 1997.

O'CONNELL, Karen *et al.* Prevalence and incidence of neuromyelitis optica spectrum disorder, aquaporin-4 antibody-positive NMOSD and MOG antibody-positive disease in Oxfordshire, UK. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 91, n. 10, p. 1126- 1128, 2020.

ORACKI SA, WALKER JA, HIBBS ML, CORCORAN LM, TARLINTON DM. Plasma cell development and survival. **Immunol Rev** 2010;237:140–59.

ORDOÑEZ-RODRIGUEZ A, ROMAN P, RUEDA-RUZAF A L, CAMPOS-RIOS A, CARDONA D. Changes in Gut Microbiota and Multiple Sclerosis: A Systematic Review. **Int J Environ Res Public Health**. 2023 Mar 6;20(5):4624. doi: 10.3390/ijerph20054624. PMID: 36901634; PMCID: PMC10001679.

PABST, O., OHL, L., WENDLAND, M., WURBEL, M. A., KREMMER, E., MALISSEN, B., & FÖRSTER, R. (2004). Chemokine receptor CCR9 contributes to the localization of plasma cells to the small intestine. **The Journal of experimental medicine**, 199(3), 411–416.
<https://doi.org/10.1084/jem.20030996>

PACHNER, A. R.; PIKE, S.; SMITH, A. D.; GILLI, F. CXCL13 as a Biomarker: Background and Utility in Multiple Sclerosis. *Biomolecules*, [S. l.], v. 14, n. 12, p. 1541, 2024. DOI: 10.3390/biom14121541.

PALACE J, Leite I, Jacob A. A practical guide to the treatment of neuromyelitis optica. *Pract Neurol* 2012;12:209–14.

PAOLICELLI, D. et al. Efficacy and Safety of Oral Therapies for Relapsing - Remitting Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, n. 0123456789, 2020.

PAPADAKIS, K. A., PREHN, J., MORENO, S. T., CHENG, L., KOUROUMALIS, E. A., DEEM, R., BREAVERMAN, T., PONATH, P. D., ANDREW, D. P., GREEN, P. H., HODGE, M. R., BINDER, S. W., & TARGAN, S. R. (2001). CCR9-positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology*, 121(2), 246–254. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.27154>

PAPADOPOULOS, Marios C.; VERKMAN, Alan S. Aquaporin 4 and neuromyelitis optica. *The Lancet Neurology*, v. 11, n. 6, p. 535-544, 2012.

PAPAIIS-ALVARENGA, Regina Maria *et al.* Central nervous system idiopathic inflammatory demyelinating disorders in South Americans: a descriptive, multicenter, cross-sectional study. *PLoS One*, v. 10, n. 7, p. e0127757, 2015.

PAPAIIS-ALVARENGA, Regina Maria *et al.* Lower frequency of antibodies to MOG in Brazilian patients with demyelinating diseases: an ethnicity influence?. *Multiple sclerosis and related disorders*, v. 25, p. 87-94, 2018.

PAPP, Viktoria *et al.* Worldwide incidence and prevalence of neuromyelitis optica: a systematic review. *Neurology*, v. 96, n. 2, p. 59-77, 2021.

PATHAK M, PADGHAN P, HALDER N, SHILPI, KULKARNI N, SONAR SA, LAL G. CCR9 signaling in dendritic cells drives the differentiation of Foxp3⁺ Tregs and suppresses the allergic IgE response in the gut. *Eur J Immunol*. 2020 Mar;50(3):404-417. doi: 10.1002/eji.201948327. Epub 2019 Dec 1. PMID: 31755547.

PERDAENS O, van PESCH V. Molecular Mechanisms of Immunosenescence and Inflammation: Relevance to the Immunopathogenesis and Treatment of Multiple Sclerosis. **Front Neurol.** 2022;12:811518. Published 2022 Feb 25. doi:10.3389/fneur.2021.811518

PEREIRA, Wildéa Lice de Carvalho Jennings *et al.* Epidemiological, clinical, and immunological characteristics of neuromyelitis optica: a review. **Journal of the neurological sciences**, v. 355, n. 1-2, p. 7-17, 2015.

PESCHL, Patrick *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein: deciphering a target in inflammatory demyelinating diseases. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 529, 2017.

PIANCONE, F. *et al.* B Lymphocytes in Multiple Sclerosis : Bregs and BTLA / CD272 Expressing-CD19 + Lymphocytes Modulate Disease Severity. **Nature Publishing Group**, n. October 2015, p. 1–11, 2016

PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C. S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. **Nature Medicine**, v. 6, n. 1, p. 67–70, jan. 2000.

PITTOCK, Sean J. *et al.* Neuromyelitis optica and non–organ-specific autoimmunity. **Archives of neurology**, v. 65, n. 1, p. 78-83, 2008

PONOMAREV, Eugene D. *et al.* GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 1, p. 39-48, 2007.

PREFONTAINE, E., SUTHERLAND, L. R., MACDONALD, J. K., & CEPOIU, M. (2009). Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. **The Cochrane database of systematic reviews**, (1), CD000067. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000067.pub2>

PRÖBSTEL AK, ZHOU X, BAUMANN R, WISCHNEWSKI S, KUTZA M, ROJAS OL, SELLRIE K, BISCHOF A, KIM K, RAMESH A, DANDEKAR R, GREENFIELD AL, SCHUBERT RD, BISANZ JE, VISTNES S, KHALEGHI K, LANDEFELD J,

KIRKISH G, LIESCHE-STARNECKER F, RAMAGLIA V, SINGH S, TRAN EB, BARBA P, ZORN K, OECHTERING J, FORSBERG K, SHIOW LR, HENRY RG, GRAVES J, CREE BAC, HAUSER SL, KUHLE J, GELFAND JM, ANDERSEN PM, SCHLEGEL J, TURNBAUGH PJ, SEEBERGER PH, GOMMERMAN JL, WILSON MR, SCHIRMER L, BARANZINI SE. Gut microbiota-specific IgA⁺ B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. ***Sci Immunol***. 2020 Nov 20;5(53):eabc7191. doi: 10.1126/sciimmunol.abc7191. PMID: 33219152; PMCID: PMC8043673.

QUIGLEY EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. ***Curr Neurol Neurosci Rep***. 2017;17(12):94. Published 2017 Oct 17. doi:10.1007/s11910-017-0802-6

RAHMAN Z, DANDEKAR MP. Crosstalk between gut microbiome and immunology in the management of ischemic brain injury. ***J Neuroimmunol***. 2021 Apr 15;353:577498. doi: 10.1016/j.jneuroim.2021.577498. Epub 2021 Jan 30. PMID: 33607506.

RAMAGOPALAN, S. V., MAUGERI, N. J., HANDUNNETTHI, L., LINCOLN, M. R., ORTON, S. M., DYMENT, D. A., DELUCA, G. C., HERRERA, B. M., CHAO, M. J., SADOVNICK, A. D., EBERS, G. C., & KNIGHT, J. C. (2009). Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D. ***PLoS genetics***, 5(2), e1000369. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000369>

RASH, John E. *et al.* Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 95, n. 20, p. 11981-11986, 1998.

RASOULI, Javad *et al.* Expression of GM-CSF in T cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN- β therapy. ***The Journal of Immunology***, v. 194, n. 11, p. 5085-5093, 2015.

RAY A, et al. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune

encephalomyelitis and multiple sclerosis. ***Journal of Neuroimmunology***. 2011; 230(1-2):1-9

RAY A, et al. A case for regulatory B cells in controlling the severity of autoimmune-mediated inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. ***Journal of Neuroimmunology***. 2011; 230(1-2):1-9

REEVES, Hollie M.; WINTERS, Jeffrey L. The mechanisms of action of plasma exchange. ***British journal of haematology***, v. 164, n. 3, p. 342-351, 2014.

RIVERA, Jose Flores *et al.* Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. ***Journal of neurology***, v. 255, p. 710-715, 2008.

ROEMER, Shanu F. *et al.* Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. ***Brain***, v. 130, n. 5, p. 1194-1205, 2007.

ROSALES, Dominique; KISTER, Ilya. Common and rare manifestations of neuromyelitis optica spectrum disorder. ***Current allergy and asthma reports***, v. 16, p. 1-8, 2016.

ROSENTHAL, Jacqueline F.; HOFFMAN, Benjamin M.; TYOR, William R. CNS inflammatory demyelinating disorders: MS, NMOSD and MOG antibody associated disease. ***Journal of Investigative Medicine***, v. 68, n. 2, p. 321-330, 2020.

SAADOUN S, PAPADOPOULOS MC. Role of membrane complement regulators in neuromyelitis optica. ***Mult Scler*** 2015;21:1644–54.

SAADOUN, Samira *et al.* Aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. ***Journal of Cell Science***, v. 118, p. 5691-5698, 2005.

SABOURI Z, et al. IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells. *Nature Communications*. 2016; 7(1): 33-81.

SABOURI Z, et al. IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells. **Nature Communications**. 2016; 7(1): 33-81.

SABOURI Z, PEROTTI S, SPIERINGS E, HUMBURG P, YABAS M, BERGMANN H, HORIKAWA K, ROOTS C, LAMBE S, YOUNG C, ANDREWS TD, FIELD M, ENDERS A, REED JH, GOODNOW CC. IgD attenuates the IgM-induced anergy response in transitional and mature B cells. **Nat Commun**. 2016;7, 13381.

SAHRAIAN, Mohammad Ali *et al*. Diagnosis and management of neuromyelitis optica spectrum disorder (NMOSD) in Iran: a consensus guideline and recommendations. **Multiple sclerosis and related disorders**, v. 18, p. 144-151, 2017.

SALTER, Michael G.; FERN, Robert. NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. **Nature**, v. 438, n. 7071, p. 1167-1171, 2005.

SANZ I, Wei C, Jenks SA, et al. Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. **Front Immunol**. 2019;10:2458. Published 2019 Oct 18. doi:10.3389/fimmu.2019.02458

SCHÄCHTLE MA, ROSSHART SP. The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease and Its Implications for Translational Research. **Front Cell Neurosci**. 2021 Jul 15;15:698172. doi: 10.3389/fncel.2021.698172. PMID: 34335190; PMCID: PMC8321234.

SCHIPPERS, A., LEUKER, C., PABST, O., KOCHUT, A., PROCHNOW, B., GRUBER, A. D., LEUNG, E., KRISSANSEN, G. W., WAGNER, N., & MÜLLER, W. Mucosal addressin cell-adhesion molecule-1 controls plasma-cell migration and function in the small intestine of mice. **Gastroenterology**, 137(3), 924–933. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.05.039>

SCHMUTZ, C., CARTWRIGHT, A., WILLIAMS, H., HAWORTH, O., WILLIAMS, J. H., AND FILER, A. (2010). Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. **Arthritis Res. Ther.** 12, R161.

SCHMUTZ, C., CARTWRIGHT, A., WILLIAMS, H., HAWORTH, O., WILLIAMS, J. H., FILER, A. (2010). Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. **Arthritis Res. Ther.** 12, R161.

SCHUMACHER, G.A.; KIBLER, B.G.; KURLAND, L.T.; KURTZKE, J.F.; MCDOWELL, F.; NAGLER, B.; SIBLEY, W.A.; TOURTELLOTT, W.W.; WILLMON, T.L. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 122: 552- 568 (1965).

SCHWEINGRUBER, Nils *et al.* Mechanisms of glucocorticoids in the control of neuroinflammation. **Journal of neuroendocrinology**, v. 24, n. 1, p. 174-182, 2012.

SCOLDING, N., BARNES, D., CADER, S., CHATAWAY, J., CHAUDHURI, A., COLES, A., ZAJICEK, J. Association of British Neurologists: revised (2015) guidelines for prescribing disease-modifying treatments in multiple sclerosis. **Practical Neurology**. 15(4), 273–279. 2015

SELLNER, Johann *et al.* EFNS guidelines on diagnosis and management of neuromyelitis optica. **European journal of neurology**, v. 17, n. 8, p. 1019-1032, 2010.

SEOK, J.M., CHO, W., CHUNG, Y.H. *et al.* Differentiation between multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder using a deep learning model. **Sci Rep** 13, 11625 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38271-x>

SEOK, J.M., CHO, W., CHUNG, Y.H. *et al.* Differentiation between multiple sclerosis and neuromyelitis optica spectrum disorder using a deep learning model. **Sci Rep** 13, 11625 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38271-x>

SERAFINI B, ROSICARELLI B, MAGLIOZZI R, *et al.* Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. **Brain Pathol** 2004;14:164-174.

SHI Z, QIU Y, WANG J, FANG Y, ZHANG Y, CHEN H, DU Q, ZHAO Z, YAN C, YANG M, ZHOU H. Dysbiosis of gut microbiota in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders: A cross sectional study. **J Neuroimmunol**. 2020 Feb 15;339:577126. doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.577126. Epub 2019 Dec 9. PMID: 31841737.

Shim JA, Ryu JH, Jo Y, Hong C. The role of gut microbiota in T cell immunity and immune mediated disorders. *Int J Biol Sci*. 2023 Feb 13;19(4):1178-1191. doi: 10.7150/ijbs.79430. PMID: 36923929; PMCID: PMC10008692.

SHIM JA, RYU JH, JO Y, HONG C. The role of gut microbiota in T cell immunity and immune mediated disorders. **Int J Biol Sci**. 2023 Feb 13;19(4):1178-1191. doi: 10.7150/ijbs.79430. PMID: 36923929; PMCID: PMC10008692.

SIDDIQUI KR, POWRIE F. CD103+ GALT DCs promote Foxp3+ regulatory T cells. **Mucosal Immunol**. 2008 Nov;1 Suppl 1:S34-8. doi: 10.1038/mi.2008.43. PMID: 19079226.

SILVA YP, BERNARDI A, FROZZA RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2020 Jan 31;11:25. doi: 10.3389/fendo.2020.00025. PMID: 32082260; PMCID: PMC7005631.

SOLER, D., CHAPMAN, T., YANG, L. L., WYANT, T., EGAN, R., & FEDYK, E. R. (2009). The binding specificity and selective antagonism of vedolizumab, an anti-alpha4beta7 integrin therapeutic antibody in development for inflammatory bowel diseases. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, 330(3), 864–875. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.153973>

SOLTYS, John *et al*. Membrane assembly of aquaporin-4 autoantibodies regulates classical complement activation in neuromyelitis optica. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 5, p. 2000-2013, 2019.

SOSPEDRA, M.; MARTIN, R. Immunology of multiple sclerosis. **Annu Rev Immunol.**, 23: 683-747, 2005;

SUPPIEJ, A.; CAINELLI, E. Cognitive dysfunction in pediatric multiple sclerosis. ***Neuropsychiatric Disease and Treatment***, 10: 1385–1392. 2014

TABARKIEWICZ, Jacek *et al.* The role of IL-17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. ***Archivum immunologiae et therapiae experimentalis***, v. 63, p. 435-449, 2015.

TABATA H, et al. Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. *Journal of Biological Chemistry*. 2000; 275(45):34998-5005

TABATA H, et al. Ligation of HLA-DR molecules on B cells induces enhanced expression of IgM heavy chain genes in association with Syk activation. ***Journal of Biological Chemistry***. 2000; 275(45):34998-5005

TAKEUCHI O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. ***Cell***. 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022

THOMPSON, A. J., BANWELL, B. L., BARKHOF, F., CARROLL, W. M., COETZEE, T., COMI, G., CORREALE, J., FAZEKAS, F., FILIPPI, M., FREEDMAN, M. S., FUJIHARA, K., GALETTA, S. L., HARTUNG, H. P., KAPPOS, L., LUBLIN, F. D., MARRIE, R. A., MILLER, A. E., MILLER, D. H., MONTALBA, X., MOWRY, E. M., ... COHEN, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. ***The Lancet. Neurology***, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)

THURSBY E, JUGE N. Introduction to the human gut microbiota. ***Biochem J***. 2017 May 16;474(11):1823-1836. doi: 10.1042/BCJ20160510. PMID: 28512250; PMCID: PMC5433529.

TIMMER, A., PATTON, P. H., CHANDE, N., MCDONALD, J. W., & MACDONALD, J. K. (2016). Azathioprine and 6-mercaptopurine for maintenance of remission in ulcerative colitis. ***The Cochrane database of systematic reviews***, 2016(5), CD000478. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD000478.pub4>

TREBST, Corinna *et al.* Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). ***Journal of neurology***, v. 261, p. 1-16, 2014.

TYLER, C. J., GUZMAN, M., LUNDBORG, L. R., YEASMIN, S., ZGAJNAR, N., JEDLICKA, P., BAMIAS, G., & RIVERA-NIEVES, J. (2022). Antibody secreting cells are critically dependent on integrin $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1 for intestinal recruitment and control of the microbiota during chronic colitis. ***Mucosal immunology***, 15(1), 109–119. <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00445-z>

VAN DER HEE B, WELLS JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. ***Trends Microbiol.*** 2021 Aug;29(8):700-712. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001. Epub 2021 Mar 2. PMID: 33674141.

VANCAMELBEKE M, VERMEIRE S. The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease. ***Expert Rev Gastroenterol Hepatol.*** 2017;11(9):821-834. doi:10.1080/17474124.2017.1343143

VASCONCELOS CCF, AURENÇÃO JCK, ALVARENGA RMP, THULER LCS. Long- term MS secondary progression: Derivation and validation of a clinical risk score. ***Clin Neurol Neurosurg.*** 2020 Jul;194:105792

VERKMAN, Alan S.; ANDERSON, Marc O.; PAPADOPOULOS, M. C. Aquaporins: important but elusive drug targets. ***Nature Review Drug Discovery***, v. 13, n. 4, p. 259-277, 2014.

WANG HX, WANG YP. Gut Microbiota-brain Axis. ***Chin Med J (Engl).*** 2016;129(19):2373-2380. doi:10.4103/0366-6999.190667

WEINSHENKER, Brian G.; WINGERCHUK, Dean M. Neuromyelitis spectrum disorders. In: ***Mayo Clinic Proceedings.*** Elsevier, 2017. p. 663-679.

WEINSHENKER, Brian G.; WINGERCHUK, Dean M. The two faces of neuromyelitis optica. ***Neurology***, v. 82, n. 6, p. 466–7, 11 fev. 2014.

WILSON, R., MAKUCH, M., KIENZLER, A. K., VARLEY, J., TAYLOR, J., WOODHALL, M., PALACE, J., LEITE, M. I., WATERS, P., & IRANI, S. R. (2018).

Condition-dependent generation of aquaporin-4 antibodies from circulating B cells in neuromyelitis optica. **Brain : a journal of neurology**, 141(4), 1063–1074. <https://doi.org/10.1093/brain/awy010>

WING, A.C.; HYGINO, J.; FERREIRA, T.B.; et al. Interleukin-17- and interleukin-22- secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. **Immunology**. 2016 Feb;147(2):212-20;

WINGERCHUK, Dean M et al. International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. **Neurology**, v. 85, n. 2, p. 177-189, 2015.

WINGERCHUK, Dean M et al. The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). **Neurology**, v. 53, n. 5, p. 1107-1107, 1999.

WINGERCHUK, Dean M. Neuromyelitis spectrum disorders. **Continuous Lifelong Learning Neurology**, v. 16, p. 105-121, 2010.

YANG, X.; PENG, J.; HUANG, X.; LIU, P.; LI, J.; PAN, J.; WEI, Z.; LIU, J.; CHEN, M.; LIU, H. Association of Circulating Follicular Helper T Cells and Serum CXCL13 With Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, p. 677190, 14 jul. 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.677190.

YOSHIDA, Hideyuki *et al.* Anti-aquaporin-4 antibody-positive optic neuritis treated with double-filtration plasmapheresis. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. 26, n. 4, p. 381-385, 2010.

ZALC B. One hundred and fifty years ago Charcot reported multiple sclerosis as a new neurological disease. **Brain**. 2018;141(12):3482-3488. doi:10.1093/brain/awy287

ZAMVIL SS, SLAVIN AJ. Does MOG Ig-positive AQP4-seronegative opticospinal inflammatory disease justify a diagnosis of NMO spectrum disorder? **Neurol**

Neuroimmunol Neuroinflamm. 2015 Jan 22;2(1):e62. doi: 10.1212/NXI.0000000000000062. PMID: 25635259; PMCID: PMC4309526.

ZEHENTMEIER S, PEREIRA JP. Cell circuits and niches controlling B cell development. **Immunol Rev.** 2019 May;289(1):142-157.

ZENG, Xiao-Ning *et al.* Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 34, n. 1, p.34–39, jan. 2007.

ZHANG, Y., HAN, J., WU, M., XU, L., WANG, Y., YUAN, W., HUA, F., FAN, H., DONG, F., QU, X., & YAO, R. (2019). Toll-Like Receptor 4 Promotes Th17 Lymphocyte Infiltration Via CCL25/CCR9 in Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, 14(3), 493–502. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09854-1>

ZHAO Q, ELSON CO. Adaptive immune education by gut microbiota antigens. **Immunology.** 2018;154(1):28-37. doi:10.1111/imm.12896

ZHAO Y, JABER V, LUKIW WJ. Gastrointestinal Tract Microbiome-Derived Pro-inflammatory Neurotoxins in Alzheimer's Disease. **J Aging Sci.** 2021;9(Suppl 5):002. Epub 2021 May 27. PMID: 34671696; PMCID: PMC8525708.

ZIKHERMAN J, PARAMESWARAN R, WEISS A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. **Nature.** 2012 Sep 6;489(7414):160-4. doi: 10.1038/nature11311. PMID: 22902503; PMCID: PMC3438375.

ZIKHERMAN J, PARAMESWARAN R, WEISS A. Endogenous antigen tunes the responsiveness of naive B cells but not T cells. **Nature** (2012) 489:160–164.