

**CENTRO UNIVERSITÁRIO PRESIDENTE TANCREDO DE ALMEIDA NEVES –
UNIPTAN**

CURSO DE MEDICINA

MAÍRA FONSECA REIS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS
AUTOIMUNES: UMA ANÁLISE COM ÊNFASE NA ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

SÃO JOÃO DEL REI, DEZEMBRO DE 2020

MAÍRA FONSECA REIS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS
AUTOIMUNES: UMA ANÁLISE COM ÊNFASE NA ECLEROSE
MÚLTIPLA**

Trabalho de Conclusão do Curso,
apresentado para obtenção do grau de
médico no Curso de Medicina do Centro
Universitário Presidente Tancredo de
Almeida Neves, UNIPTAN.

Orientador: Prof. Doutora. Suelen Martins Perobelli

SÃO JOÃO DEL REI, DEZEMBRO DE 2020

MAÍRA FONSECA REIS

**ASSOCIAÇÃO ENTRE MICROBIOTA INTESTINAL E DOENÇAS AUTOIMUNES:
UMA ANÁLISE COM ÊNFASE NA ECLEROSE MÚLTIPLA**

Trabalho de Conclusão de Curso
aprovado pela Banca Examinadora para
obtenção do Grau de médico, no Curso
de Medicina do Centro Universitário
Presidente Tancredo de Almeida Neves,
UNIPTAN.

São João Del Rei, 07 de Dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Suelen Martins Perobeli - Doutora - (UNIPTAN) – Orientadora

Prof. Luiz Eduardo Canton Santos - Doutor - (UNIPTAN)

Prof(a). Luíza Uchôa de Resende Souza - Mestre - (UNIPTAN)

Dedico este trabalho aos meus pais, à minha família, à minha orientadora e aos meus professores que são os responsáveis por eu ter chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos vão, primeiramente, ao meu amado e querido Deus sem o qual nada disso seria possível, é Ele quem me capacita e realiza todos os meus sonhos em cada detalhe da minha trajetória. Em segundo lugar, agradeço meus pais, Amilton e Cláudia, por sempre acreditarem em mim e se esforçarem tanto para garantir a minha formação, assim como fizeram pela minha irmã gêmea, vocês são a minha base e os maiores e melhores exemplos de seres humanos. Agradeço a minha irmã gêmea, Maiara, que admiro demasiadamente e que sempre tem uma palavra de calma nos meus dias mais conturbados e ansiosos (principalmente quando o assunto era estar travada no TCC). Ao meu irmão, Cleyton, que está sempre pronto a me socorrer, meus sinceros agradecimentos. Agradeço também ao meu namorado e parceiro, João Vítor, que também se doou neste trabalho e, portanto, faz parte disso tanto quanto eu. Por fim e de tamanha importância, meus sinceros agradecimentos à minha orientadora, Suelen Perobelli, que sempre acreditou no meu potencial e me proporcionou desenvolver este tema com sua orientação e todas as ferramentas necessárias para que alcançássemos este resultado. Não poderia deixar de agradecer ao nosso querido e compreensivo professor Luiz Canton que sempre esteve do nosso lado nos apoiando e nos incentivando. Todos vocês são parte da minha inspiração para ir sempre além nos meus objetivos e sonhos. Muito obrigada por isso!

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
Cora Coralina

RESUMO

INTRODUÇÃO: Foi observada a influência da microbiota intestinal na Esclerose Múltipla (EM) por meio da polarização de células T do sistema imune em células Th1/Th17, gerando resposta fortemente pró-inflamatória. Acredita-se que o mecanismo envolve o reconhecimento de antígenos relacionados às bactérias presentes no intestino de camundongos e humanos. Esses antígenos demonstram ação de mimetismo molecular com a Sequência da Glicoproteína de Oligodendrócito (MOG).|**OBJETIVO:** Avaliar estudos por meio de revisão narrativa que correlacionam a EM com a microbiota intestinal e aqueles que observaram a possibilidade de utilizar a microbiota intestinal como adjuvante ao tratamento da EM.| **METODOLOGIA:** Foram analisados 9 artigos sendo 7 ensaios clínicos randomizados com camundongos e 2 revisões sistemáticas por metanálise que foram selecionados por meio dos nossos critérios de inclusão e exclusão dos estudos encontrados nas bases de dados PubMed, Registro Central de Ensaios Controlados da Cochrane (CENTRAL), Scopus e Web of Science.| **RESULTADOS:** Nossa análise demonstrou que repostas pró-inflamatórias influenciadas pela microbiota se correlacionam com as formas de apresentação da Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) em camundongos e EM em humanos. A resposta com Th17 foi associada à ruptura da barreira hematoencefálica, propiciando o início da doença ao mesmo tempo em que reduziu a resposta anti-inflamatória com diminuição de interleucina-10. Além disso, encontramos que a *Bacteroides fragilis* foi um potente fator protetor para a EAE em camundongos gerando um ambiente anti-inflamatório com estudos concordantes.| **CONCLUSÃO:** Por meio dos estudos analisados podemos inferir que ainda há muito a ser estudado, mas o potencial terapêutico com ênfase na microbiota intestinal e sua regulação por meio de antibióticos/probióticos/prébióticos, transplantes fecais ou dieta se torna inegável e deve ser lapidado com mais estudos dado a complexidade da interação da microbiota com o sistema imunológico e deste com o Sistema Nervoso Central (SNC).

Palavras-chave: Esclerose Múltipla. EM. Microbiota intestinal. Doença autoimune. SNC.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The influence of the intestinal microbiota on Multiple Sclerosis (MS) was observed through the polarization of immune system T cells in Th1 / Th17 cells, generating a highly pro-inflammatory response. The mechanism is believed to involve the recognition of antigens related to bacteria present in the intestines of mice and humans. These antigens demonstrate molecular mimicry with the Oligodendrocyte Glycoprotein Sequence (MOG). **OBJECTIVE:** Evaluate studies through a narrative

review that correlate MS with the intestinal microbiota and those that observed the possibility of using the intestinal microbiota as an adjunct to the treatment of MS. **METHODOLOGY:** 9 articles were analyzed, 7 of which were randomized clinical trials with mice and 2 systematic reviews by a meta-analysis that were selected using our inclusion and exclusion criteria of the studies found in the databases PubMed, Central Registry of Controlled Trials of Cochrane (CENTRAL), Scopus and Web of Science. **RESULTS:** Our analysis showed that pro-inflammatory responses influenced by the microbiota correlate with the presentation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in mice and MS in humans. The Th17 response was associated with a rupture of the blood-brain barrier, enabling the onset of the disease at the same time that it reduced the anti-inflammatory response with a decrease in interleukin-10. In addition, we found that *Bacteroides fragilis* was a potent protective factor for EAE in mice, generating an anti-inflammatory environment with concordant studies. **CONCLUSION:** Through the analyzed studies we can infer that there is still much to be studied, but the therapeutic potential with emphasis on the intestinal microbiota and its regulation through antibiotics / probiotics / prebiotics, fecal transplants, or diet becomes undeniable and must be polished with more studies given the complexity of the interaction of the microbiota with the immune system and between it and the Central Nervous System (CNS).

Keywords: Multiple sclerosis. MS. Intestinal microbiota. Autoimmune disease. SNC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EM – Esclerose Múltipla

SNC – Sistema Nervoso Central

EBV – Vírus Epstein-Barr

SIC – Síndrome Clínica Isolada

EMRR – Esclerose múltipla remitente-recorrente

EMSP – Esclerose múltipla secundariamente progressiva

EMPP – Esclerose múltipla primariamente progressiva

RM – Ressonância Magnética

IL - Interleucina

HLA - Antígenos Leucocitários Humanos

CDs – Células dendríticas

NO – Óxido Nítrico

EAE - Encefalomielite autoimune experimental

DECH - Doença do enxerto contra o hospedeiro

MBP - Proteína básica da mielina

PLP – Proteolipídeo

MOG - Sequência da glicoproteína de oligodendrócito

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 METODOLOGIA.....	16
2.1 Critérios de inclusão e exclusão de estudos	17
3 RESULTADOS	18
4 DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

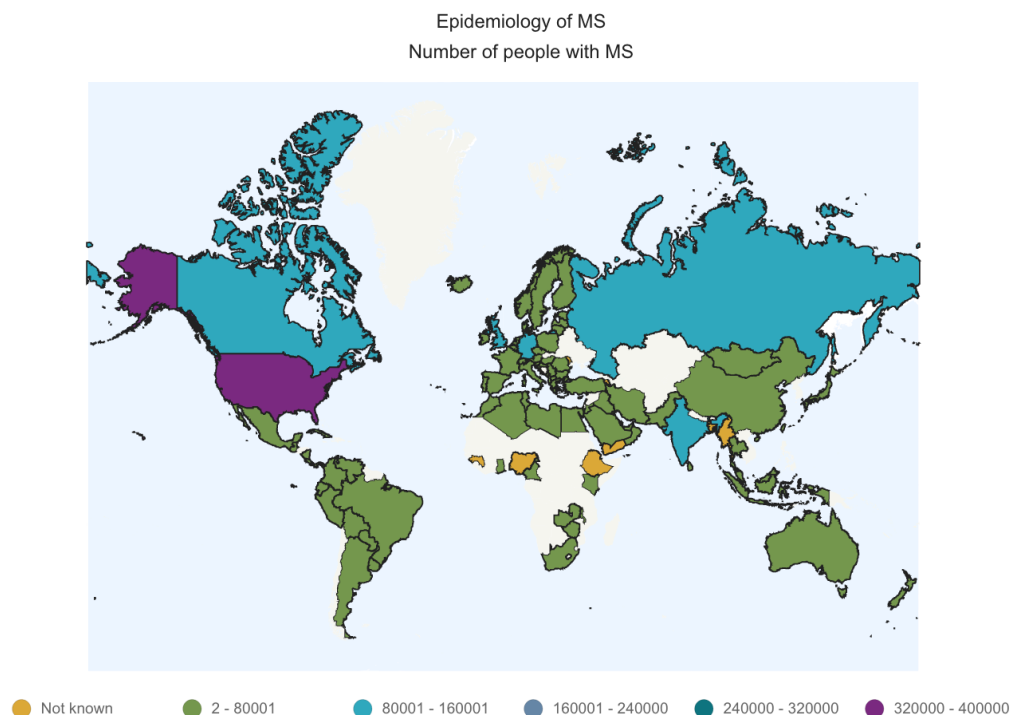
A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória crônica neurodegenerativa imunomediada, que pode ser influenciada por fatores genéticos e ambientais, cursando com desmielinização das células responsáveis pela produção da bainha de mielina nos axônios dos neurônios presentes no sistema nervoso central (SNC). Consequentemente, há dano neuro-axonal no cérebro e na medula espinhal. Este dano é atribuído à infiltração de células imunes, incluindo células T, células B e células mielóides no parênquima do SNC (1).

Embora a EM seja classicamente considerada uma doença desmielinizante da substância branca, estudos atuais demonstram que o acometimento cortical e da substância cinzenta está associado à atrofia do córtex neuronal e à pior progressão da doença (2, 3). Esta condição foi identificada, ainda, em fases iniciais da EM (4).

A lesão em decorrência da resposta inflamatória, leva ao prejuízo na condução do impulso nervoso e, com isso, o aparecimento dos sinais e sintomas, tais como alteração de sensibilidade, de cognição, alterações motoras agudas ou subagudas, queixas visuais como a neurite óptica, fadiga, espasticidade, síndromes cerebelares, entre outros (5).

A EM possui maior prevalência nas mulheres em uma proporção de 3:1 em uma faixa etária que varia entre os 10 e 50 anos (com maior pico entre os 20-40 anos). Possíveis associações de fatores de risco para a EM são infecções virais, principalmente pelo Epstein-Barr (EBV) – atuando por meio de mimetismo molecular, tabagismo (ativo ou passivo) e obesidade na adolescência (1). É a principal doença desmielinizante do SNC sendo amplamente estudada e, em termos epidemiológicos aproximadamente 2,3 milhões de pessoas têm EM no mundo. A prevalência é alta principalmente em países do hemisfério norte (6) e áreas de menor exposição solar (maior latitude), podendo estar relacionado aos baixos níveis de vitamina D (Figura 1) (1, 7-10).

Figura 1: Prevalência mundial da Esclerose Múltipla (por 100.000 indivíduos). Pode-se notar que a prevalência é mais evidente nos países de maior latitude e no ocidente. Imagem extraída do site da Federação Internacional de EM, 2013 (International Federation's Atlas of MS, 2013).



No Brasil, estima-se que existam 40.000 casos da doença, uma prevalência média de 5-20 casos por 100.000 habitantes, conforme a última atualização da Federação Internacional de Esclerose Múltipla e Organização Mundial da Saúde publicadas em 2013 (11).

A forma de apresentação clínica mais comum responsável por 85 a 90% dos casos da EM se dá por episódios reversíveis com disfunções neurológicas com duração de pelo menos 24 horas na ausência de febre, infecção ou encefalopatia, que caracteriza o estágio inicial da doença, forma conhecida como EM remitente-recorrente (EMRR) em que o paciente apresenta remissão completa ou incompleta (12). Há também a síndrome clínica isolada (SIC), representando o primeiro ataque da EM.

Com a progressão da doença, os déficits neurológicos e a incapacidade clínica podem se tornar permanentes, levando à forma conhecida como EM secundariamente progressiva (EMSP) que é precedida pela EMRR (13). Um número menor de pacientes apresenta uma progressão da doença com sintomas iniciais abruptos da EM e não entram em remissão, sendo conhecida como EM primariamente progressiva (EMPP) (14). A atividade da doença é determinada por recidivas clínicas ou

evidências, em ressonância magnética, de lesões que aumentam o contraste e/ou lesões em sequência ponderada em T2 presentes na ressonância magnética (RM) que sejam novas ou inequivocamente aumentadas (1). Fenótipos de EM expressos por recidivas (EM remitente recorrente, EM progressiva secundária com recaídas) são caracterizadas por predominância de inflamação multifocal (15).

Há uma forte correlação entre a EM e o sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (HLA), sendo o alelo HLA-DRB1 o fator de risco mais antigo e dominante identificado (16). A maioria dos genes associados à EM regula a resposta imune inata ou adaptativa. Acredita-se que variantes HLA estejam ligadas à especificidade da doença, enquanto as variantes não HLA se relacionam a aspectos complexos da ativação ou tolerância imunológica (14).

A desregulação imunológica na patologia parece originar-se em células dendríticas (CDs), que atravessam a barreira hematoencefálica e induzem a diferenciação das células T em Th1 e Th17 tornando o ambiente fortemente pró-inflamatório (17). Além disso, a indução de macrófagos e ativação microglial gera produção de outras citocinas pró-inflamatórias, radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) que causam a desmielinização e perda axonal (18). Os linfócitos T CD8+ e B de memória no SNC também estão envolvidos na fisiopatologia da doença (15, 19).

Em modelos de estudos experimentais de EM, já foi demonstrado o papel das interleucinas IL-17 e IL-23 (IL-17/IL-23) em camundongos com encefalomielite autoimune experimental (EAE). Eliminando IL-17 e IL-23, observou-se ausência da doença. A administração de anticorpos monoclonais contra IL-17 e/ou IL-23 nestes camundongos também foi capaz de suprimir a atividade da doença (20).

Atualmente, acredita-se que os agentes pertencentes da microbiota intestinal afetam profundamente a indução de algumas doenças de caráter inflamatório. Este ambiente inflamatório pode propiciar o surgimento de doenças autoimunes, inclusive da EM (21). Há estudos que comprovam a associação da microbiota intestinal com doenças de caráter imunomediado, como por exemplo a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (22) e artrite reumatoide (23). Desta forma, não é surpresa o fato de que a microbiota possa influenciar no aparecimento de doenças autoimunes, e naturalmente na EM.

Diversas hipóteses têm sido descritas sobre a etiologia da EM, mas é conhecido que as reações patológicas imunomediadas são relacionadas à resposta autoimune dirigida por células T CD4+ com perfil Th1 ou Th17 (resposta pró-inflamatória) (24). Acredita-se que a exposição dos antígenos da mielina, como proteína básica da mielina (MBP), proteolipídeo (PLP) e sequência da glicoproteína de oligodendrócito (MOG), devido a uma infecção/lesão tecidual no SNC possa favorecer o reconhecimento de antígenos por células autorreativas (25-27).

Muitos estudos vêm demonstrando a importância da flora intestinal na geração de um ambiente pró ou anti-inflamatório. Uma microbiota saudável e diversa contribui para a homeostasia do indivíduo saudável e a disbiose é um importante fator na fisiopatologia de doenças imunomediadas. Sendo a EM uma doença imunomediada, o conhecimento desse processo se torna de suma importância (20, 28)

Descrições mais detalhadas sobre a associação da EM com distúrbios da microbiota intestinal são recentes e se mostram cada vez mais relevantes (29). Camundongos com ausência de grupos bacterianos determinados são menos propensos a EAE devido à diminuição da polarização células T CD4+ em Th1, Th17 e linfócitos B autorreativos. A EAE é iniciada pelas células T CD4+ que se infiltram no SNC e induzem a formação de uma resposta imune em cascata inclusive por meio de células B produtoras de anticorpos anti MOG (24). Na EM, já foi demonstrado que existem populações bacterianas gastrointestinais significativamente diferentes em portadores de EM tratados com a droga acetato de glatiramer (uma mistura de polipeptídeo sintético que apresenta reação cruzada com a proteína básica da mielina, sendo capaz de reduzir os surtos da EM) em comparação com pessoas não tratadas (14, 30).

A ativação periférica de linfócitos T e B pode ocasionar expansão e proliferação clonal de células efectoras da inflamação, entretanto esse processo é contido efetivamente pelas células Treg em pacientes sem EM. O mesmo não é verdadeiro para os pacientes com EM e que não conseguem conter a proliferação dos linfócitos inflamatórios, o que ocasiona em indução de reação autoimune por invasão da barreira hematoencefálica (15, 17). Já foi documentado que os estágios de remissão da EMRR cursam com níveis aumentados de células Treg e, nos estágios de surto da doença esses níveis se encontram diminuídos, demonstrando a importância desse

tipo celular anti-inflamatório no mecanismo de controle da doença (20).

Através da análise dos estudos selecionados, este trabalho encontrou uma forte correlação entre a composição da microbiota e a modulação da resposta imunológica interferindo nas formas de apresentação da EM. Os fenótipos de linfócitos T, gerando respostas Th1/Th17 pró-inflamatórias foram correlacionados com o início e os surtos da doença. Já os linfócitos diferenciados para respostas Tregs anti-inflamatórias foram as formas controladoras da doença e de seus surtos. Dessa forma, uma abordagem personalizada pode ser um potencial terapêutico ou até mesmo usado como forma de prevenção da EM por meio da regulação dos agentes pertencentes à microbiota.

2 METODOLOGIA

O trabalho foi realizado por meio da busca de artigos no tema referido, utilizando a base de dados PubMed, o Registro Central de Ensaios Controlados da Cochrane (CENTRAL), Scopus e Web of Science, visando analisar qualitativamente a influência da microbiota comensal no gatilho e progressão da Esclerose Múltipla (EM).

Foram utilizados conjuntos de intersecção de termos de busca bibliográfica com os descritores “Multiple Sclerosis” e os demais: “Microbiota” “Probiotics” “Prebiotics”, “Antibiotics”. Isso, pois, a associação da EM com a microbiota vem sendo recentemente muito estudada no meio de pesquisa e descrita na literatura.

Para análises de artigos sobre microbiota e esclerose múltipla, relacionou-se o termo “Multiple sclerosis” com os seguintes filos bacterianos: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Proteobacteria*; além das ordens: *Clostridiales*, *Loactobacillales*, *Actinomycetales*, *Burkholderiales*, *Bacteroidales*, *Bifidobacteriales*, *Erysipelotrichales*, *Turicibacterales*, *Coriobacterales*, *Verrucomicrobiales*, *Enterobacteriales*. Por meio de recentes estudos no campo da pesquisa, os filos e as ordens citados vêm se mostrando cada vez mais relacionados à fisiopatologia da EM. As bactérias da microbiota modulam a resposta imunológica interferindo nas formas de apresentação da EM por meio de ou respostas pró-inflamatórias, acarretando doença, ou Tregs anti-inflamatórias controlando a doença e seus surtos (20, 24, 25).

Foram gerados gráficos referentes aos dados das buscas quantitativas dos filos e ordens bacterianos relacionados com a EM e desta com os termos “microbiota”, “probióticos” e “prebióticos” que foram representados utilizando os softwares GraphPad Prism® 8.0 e iGraph.

2.1 Critérios de inclusão e exclusão de estudos

Foram incluídos estudos de revisão sistemática por metanálise e ensaios clínicos randomizados com camundongos, que apresentassem resultados referentes ao impacto da microbiota nas formas da doença EM. Os demais critérios de inclusão foram: data de publicação entre 2000-2020, estudos realizados em animais ou humanos e publicados nos idiomas inglês e português. Foram excluídos os estudos dos demais modelos não mencionados, como observacionais, de coorte etc. e aqueles realizados em crianças. Ademais, não foram incluídos estudos que avaliaram o efeito do uso de medicamentos que não interferissem na microbiota.

3 RESULTADOS

Foram analisados 9 artigos sendo 7 ensaios clínicos randomizados com camundongos e 2 revisões sistemáticas por metanálise que foram selecionados por meio dos critérios de inclusão e exclusão. Estudos recentes nos mostram que alterações na microbiota intestinal atuam como fator de risco para a EM. Gandy *et al.* (20) demonstrou por meio do estudo das fezes dos camundongos que a microbiota intestinal pode determinar a suscetibilidade à encefalite autoimune experimental (EAE) nas formas crônica progressiva (CP-EAE) e remittente recorrente (RR-EAE), semelhante às formas EMRR ou EMPP no humano. A disbiose foi associada à suscetibilidade à EAE nos roedores. Nos camundongos tratados com antibióticos orais, foi relatado uma diminuição da gravidade da doença que foi associada com o aumento da tolerância imunológica na via de diferenciação dos linócitos T CD4⁺ em Tregs. Tal estudo, apoia fortemente a hipótese da existência da regulação exercida pela microbiota sobre formas clínicas de EAE (20).

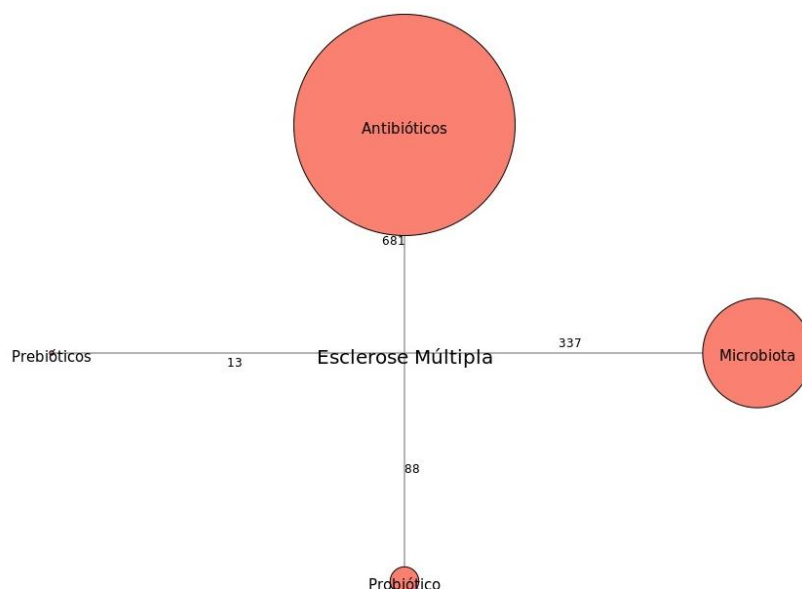
No estudo de Lee *et al.* (31) foi observado que camundongos livres de germes pertencentes à microbiota têm uma menor propensão a desenvolverem EAE, o que pode refletir uma incapacidade em ativar respostas de células T autorreativas pró-inflamatórias. Além disso, houve uma maior proporção de células CD4⁺ em CD25⁺ e Foxp3⁺ Treg nesses camundongos. Enquanto que, camundongos que foram imunizados com peptídeo MOG e expostos a patógenos específicos, apresentaram resposta T CD4⁺ (Th1 e Th17) com ambiente, conseqüentemente, mais inflamatório e desenvolvimento de EAE monitorado. Portanto, a ausência de EAE ou EAE com sintomas altamente reduzidos em camundongos livres de germes, associado à presença de doença naqueles expostos, sugere que a microbiota intestinal esteja envolvida na estimulação de respostas imunes que levam à inflamação do SNC.

Em outro estudo, conduzido por Berer *et al.* (24), foi observado que camundongos que foram criados sob exposição a patógenos específicos expressavam células T CD4⁺ com receptores que reconhecem o peptídeo MOG desenvolveram a EAE com sucessivos surtos da doença com produção de interleucina 17 (IL-17) e diferenciação da resposta em Th17. Além desse achado, que corrobora o estudo anterior, foi relatado que camundongos em condições completamente livre de germes permaneceram totalmente protegidos ao longo da

vida com déficit acentuado de células Th17. Outrossim, correlacionaram que a ativação de células T específicas para MOG no intestino é necessária para o desenvolvimento da EAE nos camundongos, mas não suficiente. Isso, pois, a produção de autoanticorpos anti-MOG também é relatada na doença e sua produção foi aumentada prontamente em camundongos livres de germes após a recolonização da microbiota.

A análise quantitativa do número de artigos demonstrou que a área da microbiota e EM é bastante estudada. Entre os meios de gerenciamento de microbiota, antibióticos prebióticos e probióticos aparecem na literatura, com destaque para os antibióticos, seguidos por probióticos (figura 2). É interessante pontuar que embora ainda não tão expressiva, a presença de estudos sobre probióticos se mostra muito relevante, pois a possibilidade de espécies pontuais poderem ser utilizadas como probióticos para tratamento e controle da EM é uma proposta tentadora.

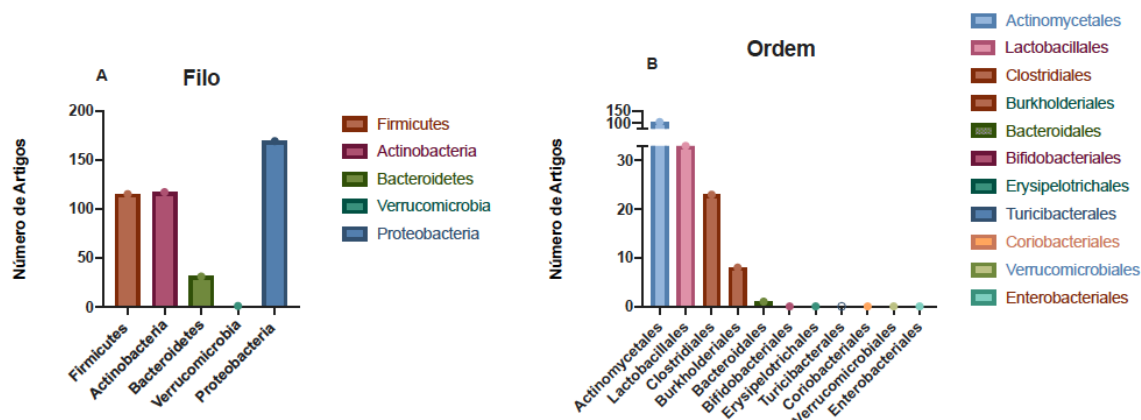
Figura 2. Análise computacional realizada no software iGraph, que demonstra a relação entre o termo “Esclerose Múltipla” e os demais termos “Microbiota”, “Probióticos” e “Prebióticos”. O tamanho das esferas representa a proporcionalmente a quantidade de citações (Dados da base Pubmed- 18/06/2020).



Quanto aos grupos taxonômicos bacterianos verificamos que a maioria de trabalhos relacionam EM com o filo *Proteobacteria*, seguido dos filos *Actinobacteria* e *Firmicutes* (figura 3A). A ordem que se mostrou mais frequente foi a *Actinomycetales*

seguida de *Lactobacillales* e *Clostridiales* em ordem decrescente de aparecimento (figura 3B).

Figura 3: Representação gráfica do número de artigos relacionando o termo “Esclerose Múltipla” e cada um dos grupos taxonômicos. (A) Filos Bacterianos. (B) Ordens Bacterianas.



Algumas bactérias, apesar de menos frequentes, como as famílias *Bacteroidaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Prevotellaceae* e *Odoribacteraceae* foram encontradas presentes exclusivamente em camundongos com a forma recorrente remitente da EAE (20). No estudo de Schepici *et al.*(32), foi feita uma comparação entre a microbiota de indivíduos com EM e indivíduos saudáveis sendo que naqueles foi registrado um aumento dos gêneros *Blautia*, *Dorea* e *Streptococcus thermophilus* (filo *Firmicutes*), *Pedobacteria* e *Flavobacterium* (filo *Bacteroidetes*), *Pseudomonas* e *Mycolpasma* (filo *Proteobacteria*), *Eggerthella lenta* (filo *Actinobacteria*) e *Akkermansia muciniphila* (filo *Verrucomicrobia*). Em contraste, foi registrado uma diminuição dos gêneros *Parabacteroides*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides coprophilus* e *Prevotella copri* (filo *Bacteroidetes*). Ademais, os mesmos autores registraram uma diminuição de algumas famílias pertencentes à ordem dos Clostridia (filo *Firmicutes*), dos gêneros *Sutturella* e *Haemophilus* (filo *Proteobacteria*), *Aldercreutzia* e *Collinella* (filo *Actinobacteria*) em pacientes com EM.

O filo *Proteobacteria* foi encontrado nas fezes de camundongos doentes com a forma recorrente remitente da EAE, em abundância, quando comparados aos camundongos doentes com a forma crônica progressiva-EAE. O filo *Bacteroidetes*, com a principal representante sendo a *Bacteroides acidifaciens*, foi evidenciada em

todas as formas de EAE e forma recorrente remitante nos camundongos do estudo de Gandy *et al.* (20), o que levou-se a acreditar que essa ordem bacteriana pode iniciar surtos da EMRR. O processo inflamatório da microbiota intestinal relacionado à doença está aumentado em modelos portadores de colite e obesidade induzida por dieta enriquecida em gordura (20, 32).

Os filos de bactérias relacionados com a forma crônica progressiva (EMPP) foi o *Verrucomicrobia*, representado pela *Akkermansia muciniphila*, presente exclusivamente no grupo da doença crônica progressiva da EAE nos camundongos, indicando um ambiente inflamatório crônico (20). Ademais, todos os filos *Firmicutes*, também foram encontrados como biomarcadores exclusivos da forma crônica progressiva da EAE desse estudo. No estudo de Mirza *et al.* (33), uma revisão sistemática, observou-se que *A. muciniphila* (filo *Verrucomicrobia*) e *Methanobrevibacter* (filo *Euryarchaeota*) encontravam-se em maior abundância nos pacientes portadores de EM, podendo estar relacionada à indução da doença.

Entretanto, Liu *et al.* (34) estudaram a associação da microbiota com o processo e evolução da EAE em camundongos intimamente relacionada à presença da bactéria *Akkermansia muciniphila*, do filo *Verrucomicrobia* por sua capacidade de degradar mucina propiciando um ambiente anti-inflamatório. Esta, em especial, foi associada a um efeito protetor por diferenciar as células T CD4⁺ em Tregs com aumento do Foxp3⁺ específico para o MOG e células Tregs do baço. O aumento dessa bactéria no pico da EAE foi correlacionado com uma tentativa de regulação para entrar na fase de remissão da doença. Foi relatado neste estudo que micro RNAs sintéticos administrados por via oral podem ser internalizados pelas *A. muciniphila* potencializando um ambiente mais anti-inflamatório.

Algumas bactérias da família *Clostridiales*, particularmente da família *Lachnospiraceae*, apresentaram diminuição do componente inflamatório, sendo o contrário verdadeiro, ou seja, quando em menores quantidades, o ambiente tornou-se mais inflamatório (20, 32). Ademais, foi relatado que os camundongos EAE que foram tratados profilaticamente ou terapêuticamente com *Bacteroides fragilis* foram capazes de gerar células dendríticas CD103⁺, que converteram células T CD4⁺ virgens em células Foxp3⁺ Treg potentes, com fator protetor para a EM (20). Ademais, Ochoa-Repáraz *et al.* (35) conduziram um estudo que relatou que o tratamento oral

com um antígeno de polissacarídeo purificado derivado de *B. fragilis* foi fator protetor para EAE em camundongos. Essa proteção foi conferida pelo acúmulo significativo de células dendríticas e células Foxp3⁺ Treg associado à redução significativa das respostas Th1 e Th17 no SNC.

Outro estudo mostrou que a IL-17 geradora de resposta Th17 foi descrita por Huppert *et al.* (36) como indutora da ruptura da barreira hematoencefálica com consequente inundação do SNC por células reativas autoimunes contribuindo, assim, na fisiopatologia da EAE. Essa ruptura envolve a formação de espécies reativas de oxigênio por NADPH oxidase e xantina oxidase. Ainda, demonstraram que o inibidor dessa cascata de ativação (o ML-7) evitou a ruptura da barreira hematoencefálica nos camundongos do estudo corroborando tal achado.

Um estudo conduzido por Stephens *et al.* (37) mostrou que uma abordagem de purificação e expansão *in vitro* com reimplantação de células Treg específicas para MBP (proteína básica da mielina) em camundongos foi suficiente para reduzir significativamente a gravidade da doença. Demonstraram, pela primeira vez, no contexto da EAE, a possibilidade de prevenir a recidiva da doença quando esta já está em curso. Enquanto que células Treg para antígenos inespecíficos podem não conferir potente proteção contra a doença. Todos estes achados corroboram para a necessidade de mais estudos com a finalidade de potencializar a terapêutica da EM em humanos contribuindo para uma melhor qualidade de vida dos indivíduos portadores da doença.

4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nos levam a acreditar que a composição da microbiota interfere na capacidade de modular a resposta imunológica do indivíduo e, conseqüentemente, nas formas de apresentação da EM. É importante relatar que a heterogeneidade na composição da microbiota entre os estudos pode relacionar-se às diferenças na origem de casos e controles e suas características. Ademais, a microbiota é um tema muito complexo dado essas diferenças individuais possíveis de serem encontradas.

Dois estudos (24, 31) concordaram em seus resultados em que camundongos livres de germes possuíam menor propensão a desenvolver EAE. Esses camundongos obtiveram aumento da resposta anti-inflamatória, por meio de aumento das células T CD4⁺ polarizada para CD25⁺ e Foxp3 Treg, e diminuição em sua resposta celular Th1 e Th17 pró-inflamatória, conferindo proteção contra EAE. Além disso, os camundongos expostos a patógenos específicos e imunizados com o peptídeo Sequência da Glicoproteína de Oligodendrócito (MOG) desenvolveram EAE.

Além disso, dois outros estudos (20, 35) realizados em camundongos associaram a *Bacteroides fragilis* (filó *Bacteroidetes*) como fator protetor para EAE por aumento dos níveis de células polarizadas para Foxp3 Treg e diminuição das respostas Th1 e Th17. Todos os artigos analisados correlaciona a resposta imune polarizada para Treg como protetora da EAE em camundongos e EM em humanos.

Em nossa análise quantitativa, vimos que o número de artigos que associam a EM com prebióticos e probióticos ainda se mostra pouco expressiva, mas possui um potencial terapêutico tentador e precisa ser mais difundido no meio médico/acadêmico para suscitar novas pesquisas com a finalidade de melhorar os meios de tratamento da EM e possibilitar melhor qualidade de vida e longevidade aos portadores da doença.

A análise qualitativa da taxonomia das bactérias mais citadas nos estudos (32, 33) nos mostrou que o filo *Bacteroidetes* com seus representantes sendo a *Prevotella copri*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides coprophilus* se encontravam diminuídas em pacientes com EM comparado com pacientes sem a

doença. No estudo em camundongos de Gandy *et al.* (20), o filo *Firmicutes* com o principal representante sendo *Clostridia* estava diminuída em camundongos com EAE em consonância com o estudo de Shepici *et al.* (32) que também observou essa diminuição em humanos com EM.

A maioria dos estudos analisados demonstrou aumento da bactéria *Akkermansia muciniphila*, do filo *Verrucomicrobia*, em pacientes com EM ou camundongos com EAE sendo que a grande parte dos autores (20, 32, 33) associou esse aumento a maior propensão à doença e seus surtos. Enquanto que um único estudo (34) que observou especificamente a *A. muciniphila* em camundongos correlacionou a sua capacidade de degradar mucina como efeito protetor por diferenciar as células T CD4+ em Treg específicas para o MOG, criando um ambiente anti-inflamatório. O aumento dessa bactéria no pico da EAE foi correlacionado neste estudo com uma tentativa de regulação para entrar na fase de remissão da doença. A administração via oral de micro RNAs sintéticos descrita nesse ensaio clínico demonstrou que eles podem ser internalizados pelas *A. muciniphila*, o que potencializou um ambiente mais anti-inflamatório.

O estudo de Stephens *et al.* (37) mostrou que a purificação e expansão *in vitro* com reimplantação de células Treg específicas para MBP (proteína básica da mielina) em camundongos com EAE reduziu significativamente a gravidade da doença possibilitando, dessa forma, a prevenção das recidivas da EAE. Importante ressaltar que a implantação de células com antígenos pouco específicos pode não conferir potente proteção contra a doença. Outro estudo (20) relatou que camundongos tratados com antibiótico oral tiveram uma diminuição na gravidade da EAE com consequente aumento da tolerância imunológica.

Um interessante estudo (36) correlacionou a resposta polarizada para Th17 rica em IL-17 com o aumento da ativação de espécies reativas de oxigênio e consequente ruptura da barreira hematoencefálica e ambiente pró-inflamatório no SNC contribuindo para a lesão axonal/neuronal em camundongos. Ainda, demonstraram que o inibidor dessa cascata de ativação (o ML-7) evitou a ruptura da barreira hematoencefálica nos camundongos do estudo corroborando tal achado. Outro estudo (17) correlacionou o aumento de células Th17 com a diminuição de IL-10, com consequente diminuição da resposta anti-inflamatória levando à instabilidade da doença.

Por meio dos estudos analisados podemos inferir que ainda há muito a ser estudado, mas o potencial terapêutico com ênfase na microbiota intestinal e sua regulação por meio de antibióticos/probióticos/prebióticos, transplantes fecais ou dieta se torna inegável e deve ser lapidado com mais estudos dado a complexidade da interação da microbiota com o sistema imunológico e deste com o SNC. Com isso, pode-se melhorar a qualidade de vida dos portadores da EM com possíveis baixos efeitos colaterais, visto que a intervenção está relacionada a processos fisiológicos do organismo humano.

Contudo, a EM é uma doença heterogênea e, possivelmente, haverá respondedores e não respondedores ao tratamento. A possibilidade de uma medicina personalizada com biomarcadores e microbiota intestinal analisados individualmente para cada portador da EM com imagens avançadas se mostra uma possibilidade tentadora de tratamento e prevenção a fim de impedir, principalmente, a forma progressiva da doença em que poucos tratamentos são eficazes (14). Entretanto, o alto custo desse padrão de tratamento reflete a baixa disponibilidade desta opção atualmente.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho buscou-se estudar a associação entre a EM com as alterações da microbiota intestinal. Entender a influência da microbiota na EM é relevante, pois pode-se salientar a busca de meios terapêuticos mais direcionados a exemplo da composição da microbiota intestinal com potencial de melhora na qualidade de vida dos portadores desta doença.

A regulação/modulação da microbiota pode se tornar um potente alvo terapêutico focado no impacto e qualidade de vida destes pacientes, na medida em que puder impedir a progressão da ou impedir a doença e oferecer um tratamento de custo acessível para que não se torne algo distante da realidade para os pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, et al. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):43.
2. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
3. Fisniku LK, Chard DT, Jackson JS, Anderson VM, Altmann DR, Miszkief KA, et al. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2008;64(3):247-54.
4. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2188-97.
5. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.
6. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*. 2014;83(11):1022-4.
7. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(10):1132-41.
8. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2006;296(23):2832-8.
9. Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag*. 2015;5(5):413-24.
10. Aranow C. Vitamin D and the immune system. *J Investig Med*. 2011;59(6):881-6.
11. Evans C, Beland SG, Kulaga S, Wolfson C, Kingwell E, Marriott J, et al. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2013;40(3):195-210.
12. Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1994;36 Suppl:S6-11.
13. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
14. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*. 2018;97(4):742-68.

15. Grigoriadis N, van Pesch V, Group P. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *Eur J Neurol*. 2015;22 Suppl 2:3-13.
16. Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, et al. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2005;77(3):454-67.
17. Hu D, Notarbartolo S, Croonenborghs T, Patel B, Cialic R, Yang TH, et al. Transcriptional signature of human pro-inflammatory T. *Nat Commun*. 2017;8(1):1600.
18. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:247-69.
19. Malmeström C, Lycke J, Haghighi S, Andersen O, Carlsson L, Wadenvik H, et al. Relapses in multiple sclerosis are associated with increased CD8+ T-cell mediated cytotoxicity in CSF. *J Neuroimmunol*. 2008;196(1-2):159-65.
20. Gandy KAO, Zhang J, Nagarkatti P, Nagarkatti M. The role of gut microbiota in shaping the relapse-remitting and chronic-progressive forms of multiple sclerosis in mouse models. *Sci Rep*. 2019;9(1):6923.
21. Elson CO, Alexander KL. Host-microbiota interactions in the intestine. *Dig Dis*. 2015;33(2):131-6.
22. Michonneau D, Latis E, Curis E, Dubouchet L, Ramamoorthy S, Ingram B, et al. Metabolomics analysis of human acute graft-versus-host disease reveals changes in host and microbiota-derived metabolites. *Nat Commun*. 2019;10(1):5695.
23. Bodkhe R, Balakrishnan B, Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019;11:1759720X19844632.
24. Berer K, Mues M, Koutrolas M, Rasbi ZA, Boziki M, Johnner C, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*. 2011;479(7374):538-41.
25. Carvalho A, Sant'anna G, Santos CC, Frugulhetti IP, Leon SA, Quírico-Santos T. [Determination of autoantibody for myelin antigens in the serum of patients HLA-DQB1*0602 with multiple sclerosis]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2003;61(4):968-73.
26. Martin R, Bielekova B, Gran B, McFarland HF. Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in Multiple Sclerosis. *J Neural Transm Suppl*. 2000(60):361-73.
27. Dang AK, Jain RW, Craig HC, Kerfoot SM. B cell recognition of myelin oligodendrocyte glycoprotein autoantigen depends on immunization with protein rather than short peptide, while B cell invasion of the CNS in autoimmunity does not. *J Neuroimmunol*. 2015;278:73-84.
28. Taur Y, Jenq RR, Perales MA, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2014;124(7):1174-82.

29. Kirby TO, Ochoa-Repáraz J. The Gut Microbiome in Multiple Sclerosis: A Potential Therapeutic Avenue. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(3).
30. Cantarel BL, Waubant E, Chehoud C, Kuczynski J, DeSantis TZ, Warrington J, et al. Gut microbiota in multiple sclerosis: possible influence of immunomodulators. *J Investig Med*. 2015;63(5):729-34.
31. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108 Suppl 1:4615-22.
32. Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, Mazzon E. The Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: An Overview of Clinical Trials. *Cell Transplant*. 2019;28(12):1507-27.
33. Mirza A, Forbes JD, Zhu F, Bernstein CN, Van Domselaar G, Graham M, et al. The multiple sclerosis gut microbiota: A systematic review. *Mult Scler Relat Disord*. 2020;37:101427.
34. Liu S, Rezende RM, Moreira TG, Tankou SK, Cox LM, Wu M, et al. Oral Administration of miR-30d from Feces of MS Patients Suppresses MS-like Symptoms in Mice by Expanding *Akkermansia muciniphila*. *Cell Host Microbe*. 2019;26(6):779-94.e8.
35. Ochoa-Repáraz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, et al. A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol*. 2010;3(5):487-95.
36. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *FASEB J*. 2010;24(4):1023-34.
37. Stephens LA, Malpass KH, Anderton SM. Curing CNS autoimmune disease with myelin-reactive Foxp3⁺ Treg. *Eur J Immunol*. 2009;39(4):1108-17.