

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

João Batista Costa Neto

**ANÁLISE DO ÍNDICE DE ANTICORPOS IGG DO VÍRUS ANTI-EPSTEIN-  
BARR LÍQUOR/SORO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS  
DESMIELINIZANTES**

Santa Maria, RS  
2024

João Batista Costa Neto

**ANÁLISE DO ÍNDICE DE ANTICORPOS IGG DO VÍRUS ANTI-EPSTEIN-BARR  
LÍQUOR/SORO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS DESMIELINIZANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Paniz  
Coorientador: Prof. Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS  
2024

## Ficha catalográfica da biblioteca

Costa Neto, João Batista  
ANÁLISE DO ÍNDICE DE ANTICORPOS IGG DO VÍRUS ANTI  
EPSTEIN-BARR LÍQUOR/SORO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS  
DESMIELINIZANTES / João Batista Costa Neto.- 2024.  
61 p.; 30 cm

Orientador: Clóvis Paniz  
Coorientador: José Antonio Mainardi de Carvalho  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2024

1. Esclerose Múltipla 2. Líquido Cefalorraquíano 3.  
Bandas Oligoclonais 4. Epstein-Barr Vírus 5. Reibergrama  
I. Paniz, Clóvis II. de Carvalho, José Antonio Mainardi  
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.


Declaro, JOÃO BATISTA COSTA NETO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

João Batista Costa Neto

**ANÁLISE DO ÍNDICE DE ANTICORPOS IGG DO VÍRUS ANTI-EPSTEIN-BARR  
LÍQUOR/SORO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS DESMIELINIZANTES**


Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 20 de junho de 2024:**

Documento assinado digitalmente  
 **CLOVIS PANIZ**  
Data: 09/07/2024 10:41:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

**Clóvis Paniz, Dr. (UFSM)  
(Presidente/Orientador)**

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE ANTONIO MAINARDI DE CARVALHO**  
Data: 17/07/2024 19:51:41-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

**José Antonio Mainardi de Carvalho, Dr. (UFSM)  
(Coorientador)**

Documento assinado digitalmente  
 **ARAMYS SILVA DOS REIS**  
Data: 17/07/2024 16:21:26-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Aramys Silva dos Reis, Dr. (UFMA)**

Documento assinado digitalmente  
 **JOSE EDSON PAZ DA SILVA**  
Data: 18/07/2024 16:57:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**José Edson Paz da Silva, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2024

Dedico este trabalho ao pioneirismo do Laboratório de Análises Clínicas Aplicadas (LAPACA) por acreditar na Liquorologia Laboratorial como uma especialidade assertiva e resolutiva no neurodiagnóstico.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me ilumina todo santo dia com sua luz e me dá forças para seguir o meu propósito de vida com minha família.

À minha esposa farmacêutica bioquímica Claudia, ao meu primogênito Pedro e a minha caçula Isabela, por estarem me apoiando, em mais uma etapa.

Aos meus pais, João Batista e Sônia, pelo amor, carinho e apoio há 45 anos.

A minha sogra, Noely (*in memoriam*), que não mediu esforços para o meu sucesso até seu último segundo de vida, ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clóvis Paniz, meu colega de turma de graduação, por me aceitar como seu aluno e depositar tanta confiança em mim como aspirante à pesquisador. Não posso medir o meu crescimento nestes anos e sou grato pelo conhecimento transmitido, em meio à docência orientada, que só fizeram aumentar minha admiração e respeito pelo ser humano e profissional que é.

Aos membros do LAPACA, principalmente meu coorientador Prof. Dr. José Mainardi, às mestrandas Ana, Laura, e Laura Bonai, e aos alunos de iniciação científica: Luísa, Ighor, Nicole, Syang e Cecília, pela ajuda na captação das amostras e dados dos pacientes.

Ao Prof. Dr. José Edson, por ter me inspirado na graduação e pós-graduação a buscar o nosso justo propósito de vida.

Aos funcionários do DACT pelo apoio durante esses anos, em especial nossa colega Dra. Marinês.

Aos meus colegas e alunos do curso de farmácia da UFSM, que me fizeram descobrir o entusiasmo pela docência e despertaram em mim a vontade de persistir neste caminho que é tão gratificante.

Aos colegas que participam do Projeto da Academia do Líquor, no compartilhamento de casos e discussões relevantes para publicações e inovações.

Ao Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), em especial aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) que sempre estiveram solícitos no apoio.

A Dra. Thalita Freitas e ao time do Hospital Neurológico de Goiânia (ING-GO) pela parceria e por acreditarem nesse projeto inovador e pioneiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPG-CF) e a Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), por mais uma oportunidade de concretizar mais um sonho, que ficou guardado na gaveta por 20 anos.

A mente que se abre  
a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original.  
(Prof. Dr. Albert Einstein)

## RESUMO

### ANÁLISE DO ÍNDICE DE ANTICORPOS IGG DO VÍRUS ANTI-EPSTEIN-BARR LÍQUOR/SORO E SUA ASSOCIAÇÃO COM DOENÇAS DESMIELINIZANTES

AUTOR: João Batista Costa Neto  
ORIENTADOR: Dr. Clóvis Paniz  
COORIENTADOR: Dr. José Antônio Mainardi de Carvalho

As doenças desmielinizantes são um grupo de enfermidades com gatilhos diversos e não específicos, de origem infecciosa e/ou autoimune, que partem do princípio inflamatório da perda da mielina dos neurônios, gerando uma série de sinais e sintomas, que exige um diagnóstico multifatorial. Os exames que apoiam o diagnóstico diferencial, assim como sinalizam os prováveis caminhos investigativos, envolvem o líquido cefalorraquiano (LCR) na rotina e nas avaliações de detecção da síntese intratecal. O fator desencadeante para doenças desmielinizantes sempre foi um enigma, mas em meados de 2023, Bjornevik e colaboradores demonstraram a correlação desta doença com o vírus Epstein-Barr (EBV). Assim, este estudo teve como objetivo determinar as concentrações de anticorpos IgG específicos para EBV VCA, no LCR e soro, e verificar o índice de anticorpos específicos (IAE) associando com os demais exames como bandas oligoclonais (BOC), o normograma de Reiber, e aos achados clínico laboratoriais dos pacientes com doenças desmielinizantes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria – RS (HUSM) e no Instituto Neurológico de Goiânia (ING), entre 1 de março de 2022 e 31 de março de 2024. Foram selecionados 61 pacientes, com idades que variaram de 28 dias a 84 anos, e separados em 2 grupos, sendo 34 pacientes com doenças desmielinizantes (DESM), e outro com 27 pacientes sem doenças desmielinizantes relacionadas (NDESM). Foram realizados a BOC, a pesquisa de anti-AQP4 IgG e de anti-MOG IgG, as dosagens de IgG e de albumina no soro e LCR, os normogramas de Reiber, as dosagens da atividade de marcação de anticorpos para EBV VCA IgG, e posteriormente foi calculado o IAE. Os pacientes DESM na maioria foram mulheres na proporção de 1,6:1, e estes apresentaram maior incidência da atividade de anticorpos para EBV VCA IgG frente aos pacientes NDESM, tanto no soro quanto no LCR. Pacientes entre 1 e 18 anos foram 100% não reagentes para a atividade de marcação de anticorpos EBV VCA IgG. A presença de BOC foi detectada em 33,3% dos pacientes DESM com EM. Os pacientes NDESM recém nascidos apresentaram altos títulos de anticorpos EBV VCA IgG no LCR. A presença de síntese intratecal avaliada pelo reibergrama foi concordante em 88,9% dos pacientes com a presença de BOC. O IAE EBV VCA IgG foi inferior a 2,5 em 96,9% nos pacientes DESM, mesmo na presença de BOC e com o reibergrama apresentando presença de síntese intratecal. Estas associações evidenciaram que pacientes DESM, mesmo na presença de síntese intratecal detectadas pela BOC e reibergrama sendo reagentes para EBV VCA IgG, tanto no soro e no LCR, na sua grande maioria apresentaram IAE dentro dos valores de normalidade.

**Palavras-chave:** Esclerose Múltipla. Líquido cefalorraquiano. Bandas oligoclonais. Epstein-Barr vírus. Reibergrama.



## ABSTRACT

### ANALYSIS OF THE IGG ANTIBODY INDEX OF THE EPSTEIN-BARR ANTIBODY VIRUS CSF/SERM AND ITS ASSOCIATION WITH DEMYELINATING DISEASES

AUTHOR: João Batista Costa Neto

ADVISOR: Dr. Clovis Paniz

CO-ADVISOR: Dr. Jose Antônio Mainardi de Carvalho

Demyelinating diseases are a group of illnesses with diverse and non-specific triggers, of infectious and/or autoimmune origin, which are based on the inflammatory principle of loss of myelin from neurons, generating a series of signs and symptoms, which require a multifactorial diagnosis. The tests that support the differential diagnosis, as well as signaling the likely investigative paths, involve cerebrospinal fluid (CSF) in routine and assessments to detect intrathecal synthesis. The trigger for demyelinating diseases has always been an enigma, but in mid-2023, Bjornevik and colleagues demonstrated the correlation of this disease with the Epstein-Barr virus (EBV). Thus, this study aimed to determine the concentrations of IgG antibodies specific to EBV VCA, in CSF and serum, and verify the specific antibody index (SAI) in association with other tests such as oligoclonal bands (OCB), the Reiber normogram, and clinical laboratory findings of patients with demyelinating diseases treated at the Hospital Universitario de Santa Maria – RS (HUSM) and at the Instituto Neurológico de Goiania (ING), between March 1, 2022 and March 31, 2024. Sixty-one patients were selected, with ages ranging from 28 days to 84 years, and separated into 2 groups, 34 patients with demyelinating diseases (DESM), and another 27 patients without related demyelinating diseases (NDESM). OCB, anti-AQP4 IgG and anti-MOG IgG research, IgG and albumin measurements in serum and CSF, Reiber normograms, measurements of antibody marking activity for EBV VCA IgG were performed, and subsequently, the IAE was calculated. The majority of DESM patients were women in a ratio of 1.6:1, and they had a higher incidence of the presence of EBV VCA IgG antibody activity compared to NDESM patients, both in serum and CSF. Patients between 1 and 18 years old were 100% non-reactive for EBV VCA IgG antibody marking activity. The presence of OCB was detected in 33.3% of DESM patients with MS. Newborn NDESM patients showed high titers of EBV VCA IgG antibodies in CSF. The presence of intrathecal synthesis assessed by reibergram was concordant in 88.9% of patients with the presence of OCB. IAE EBV VCA IgG was lower than 2.5 in 96.9% of DESM patients, even in the presence of OCB and with reibergram showing the presence of intrathecal synthesis. These associations showed that DESM patients, even in the presence of intrathecal synthesis detected by OCB and reibergram being reagents for EBV VCA IgG, both in serum and CSF, in the vast majority of cases presented SAI within normal values.

**Keywords:** Multiple sclerosis. Cerebrospinal fluid. Oligoclonal bands. Epstein-Barr virus. Reibergram.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1 -</b>	Estrutura do Epstein-Barr Vírus .....	19
<b>FIGURA 2 -</b>	Ciclo de resposta imunológica do vírus Epstein-Barr, por classe e tipo de anticorpo versus a linha do tempo no soro .....	21
<b>FIGURA 3 -</b>	Neurodegeneração na EM e respostas inflamatórias avaliadas na coleta do LCR .....	24
<b>FIGURA 4 -</b>	Perfis de resultados do exame de pesquisa de Bandas Oligoclonais IgG .....	31
<b>FIGURA 5 -</b>	Ilustração da barreira hemato encefálica (BHE) .....	31
<b>FIGURA 6 -</b>	Mecanismo Índice de Anticorpos Específicos .....	33
<b>FIGURA 7 -</b>	Valores de interpretação para o Índice de Anticorpos Específicos (IAE) .....	36
<b>FIGURA 8 -</b>	Modelos Normogramas de Reiber IgG, IgM e IgA .....	38
<b>FIGURA 9 -</b>	Desenho do estudo e estratificação dos pacientes .....	39
<b>FIGURA 10-</b>	Índice de anticorpos específicos (IAE) para EBV VCA IgG .....	46
<b>FIGURA 11-</b>	Distribuição por região no reibergrama IgG dos pacientes DESM .....	47
<b>FIGURA 12-</b>	Distribuição por região no reibergrama IgG dos pacientes DESM com EM .....	48
<b>FIGURA 13 -</b>	Distribuição por região no reibergrama dos pacientes DESM com bandas oligoclonais presentes .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Ciclo de resposta imunológica, por classe e tipo de antígeno ....	20
<b>TABELA 2</b> - Dados gerais dos pacientes DESM e NDESM .....	44
<b>TABELA 3</b> - Medianas de unidades e frequência de pacientes reagentes para EBV VCA IgG .....	45
<b>TABELA 4</b> - Índice de Anticorpos Específicos EBV VCA IgG de pacientes do grupo de doenças desmielinizantes .....	46
<b>TABELA 5</b> - Perfil do reibergrama dos pacientes DESM (n=29) que realizaram a determinação das BOC e o IAE VCA IgG .....	49

## LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1 - Critérios de Macdonald para diagnóstico de esclerose múltipla . 26**

**LISTA DE SIGLAS**

AAN	Academia Americana de Neurologia
AQP4	Aquaporina 4
BCTRIMS	Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla
BHE	Barreira hemato encefálica
BHL	Barreira hemato líquórica
BOC	Bandas oligoclonais
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupo de diferenciação)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
EA	Antígenos iniciais
EBV	Epstein-Barr Vírus
EBNA	Antígenos de núcleo
EM	Esclerose Múltipla
ELISA	Enzimoimunoensaio
HD	Hipótese diagnóstica
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
IA	Índice de Anticorpos
IAE	Índice de Anticorpos Específicos
IEF	Isoeletrofocalização
ING	Instituto de Neurologia de Goiânia
IgG	Imunoglobulina G
LCR	Líquido Cefalorraquiano e/ou Cefalorraquidiano e/ou Líquor
ME	Medula espinhal

MO	Medula óssea
MOG	Glicoproteína da Mielina do Oligodentrócito
MOGAD	Distúrbio Associado à Glicoproteína da Mielina do Oligodentrócito
NMOSD	Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica
OCB	Oligoclonal Bands
OPC	Oligodentrócitos progenitores
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAGE	Gel agarose poliacrilamida
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
VCA	Antígeno do capsídeo viral
WB	<i>Western blotting</i>
WHO	World Health Organization
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
ULAC	Unidade Laboratório de Análises Clínicas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	JUSTIFICATIVA .....	16
1.2	OBJETIVOS .....	16
1.2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	16
1.2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	16
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1	EPSTEIN-BARR VÍRUS .....	17
2.2	ESCLEROSE MÚLTIPLA .....	21
2.3	DISTÚRBO DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA (NMOSD) .....	26
2.4	DOENÇA DO ANTICORPO CONTRA GLIPROTEÍNA DO OLIGODENTRÓCITO (ANTI-MOG) - MOGAD .....	28
2.5	LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO.....	28
2.6	BARREIRA HEMATO ENCEFÁLICA (BHE) .....	31
2.7	ÍNDICE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS (IAE) .....	32
2.8	REIBERGRAMA .....	36
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
3.1	DESENHO DO ESTUDO .....	39
3.2	METODOLOGIA DAS ANÁLISES .....	40
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	52
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## 1 INTRODUÇÃO

Os processos desmielinizantes são um grupo de doenças com gatilhos diversos e não específicos, de origem infecciosa e/ou autoimune, que partem do princípio inflamatório da perda da mielina, na bainha da mielina dos neurônios, gerando uma série de sinais e sintomas (KUNKL, *et al.*, 2020).

Dentre as doenças desmielinizantes, destaca-se a esclerose múltipla (EM), a qual afeta cerca de 2,8 milhões de pessoas no mundo (WALTON, *et al.*, 2020), e no Brasil apresenta uma prevalência média de 8,69 casos por 100 mil habitantes (PEREIRAL, *et al.*, 2015) com uma estimativa de que cerca de 40.000 pacientes vivam com a doença (BRASIL, 2015).

O diagnóstico da EM ainda é muito complexo e multifatorial, uma vez que não existem marcadores ou testes diagnósticos específicos. Ao longo da evolução da medicina, vários modelos foram tentados, esquematizados e propostos, a fim de orientar e facilitar o diagnóstico dessa doença. Atualmente, são os critérios de McDonald, descritos inicialmente em 2001 e atualizados posteriormente, que são os mais frequentemente utilizados para o diagnóstico (BRASIL, 2015).

Em 2023, Bjornevik e colaboradores, demonstraram uma associação entre a reativação do vírus Epstein-Barr (EBV) e o desenvolvimento da EM. Este estudo ampliou discussões sobre a possibilidade de um agente causal para a EM e outras abordagens diagnósticas.

Assim o EBV entrou no radar de investigação principalmente quando há a presença de reativação de anticorpos em uma fase posterior a infecção primária da mononucleose infecciosa (MI), e isso pode ocorrer até 20 a 30 anos depois da primeira infecção (LEVIN, 2005). Com essa reativação do EBV, há um risco 32 vezes maior no curso do aparecimento das doenças desmielinizantes (BJORNEVIK, 2023), e nessa linha surge um novo caminho investigativo que se faz necessário para correlações de parâmetros diagnósticos incluindo os exames laboratoriais no sangue e no líquido cefalorraquiano (LCR).

O LCR já foi referendado nos critérios diagnósticos de EM, segundo McDonald (2017). Entretanto, agora se faz necessário ampliar e entender o perfil de comportamento imunológico dos marcadores sorológicos e da síntese intratecal através do uso do índice de anticorpos específicos (IAE) para EBV. O entendimento desse novo caminho tem potencial para compreendermos se a correlação com o EBV



existe e se ele pode ser um marcador de apoio diagnóstico em doenças desmielinizantes.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, a comunidade científica vem tentando associar gatilhos infecciosos para o aparecimento das doenças inflamatórias crônicas e neurodegenerativas (causada pelas células imunológicas que atacam as células próprias do SNC), com o aparecimento de desmielinização, como aquela que ocorre na EM.

Em 2023 com a publicação de Bjornevik e colaboradores, o EBV foi relacionado com o desenvolvimento da EM e assim observamos que há uma oportunidade inédita no Brasil, para buscar essa associação com o apoio de marcadores adicionais aos exames tradicionais da pesquisa de BOC e avaliação do reibergrama.

Tradicionalmente o LCR já é uma importante ferramenta paraclínica para apoio diagnóstico na diferenciação com outras doenças que também geram a desmielinização, os mesmos sinais, os mesmos sintomas e os mesmos resultados em exames de imagem em ressonância magnética (RM) de crânio e coluna. Com isso a determinação do IAE (líquor/soro) do vírus EBV em pacientes com doenças desmielinizantes, usando a técnica anticorpos *Virus Capsid Antigen* (VCA) por ELISA, pode se tornar um marcador adicional na compreensão do apoio diagnóstico.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Determinar as concentrações de anticorpos IgG específicos para EBV (no LCR e soro) calculando o índice de anticorpos específicos (IAE) em pacientes com doenças desmielinizantes.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Investigar a presença do IAE IgG, na relação líquido/soro, para o vírus do EBV a partir da técnica de anticorpos *Virus Capsid Antigen* (VCA) por ensaio imunoenzimático (ELISA);

Estabelecer um perfil líquórico laboratorial para as bandas oligoclonais (BOC);

Verificar quantitativamente a presença da síntese intratecal IgG total aplicando os normogramas de Reiber;

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPSTEIN-BARR (EBV)

O EBV é um vírus DNA classificado na família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus* (vírus do herpes gama 1) e da espécie *Herpes vírus humano tipo 4*, que infecta seres humanos. Até o presente, foram descritas duas variedades de EBV: o tipo 1 e o tipo 2, que se distinguem pelos genes que codificam algumas das proteínas nucleares (GEQUELIN *et al*, 2011; SANGUEZA-ACOSTA *et al*, 2018).

Sua descoberta ocorreu em 1964, através da microscopia eletrônica de células cultivadas de linfoma de Burkitt (LB) por Michael Epstein, Ivonne Barr e Bert Achong. Dessa forma, o LB tornou-se o primeiro tumor humano com uma associação direta com a presença de um vírus (COHEN, 2000). Em 1968, o EBV foi identificado como o agente etiológico da mononucleose infecciosa (MI). Em 1970, o DNA do EBV foi detectado em tecidos de pacientes com carcinoma nasofaríngeo. Nos anos seguintes, ainda na década de 1980, foi associado a pacientes com linfoma (HALL *et al*, 2015).

O EBV apresenta distribuição universal, sendo mais frequente nos países em desenvolvimento, como uma causa infecciosa muito comum, e está presente em torno de 90% a 95% da população adulta (AL-OBAIDI *et al.*, 2022; HESS, 2004). O EBV também é leigamente conhecido como “doença do beijo”, por manifestar-se com maior frequência como MI em pacientes mais jovens (MOHSENI, 2024). Em recém nascidos (RN) a presença de altos títulos de anticorpos é recorrente, devido a transmissão materno-fetal, e após 1 a 3 meses os títulos reduzem, voltando e aparecer após uma infecção primária (ABRAHAMYAN, 2020; SHARIPOUR, 2020).

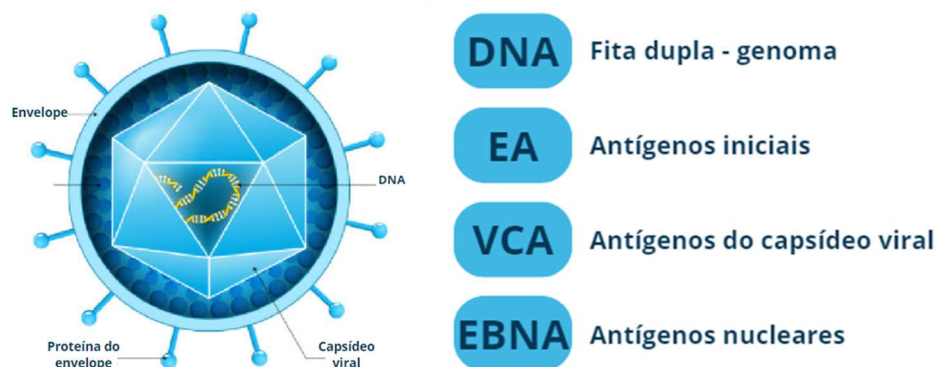
O ciclo de vida do EBV inicia quando o genoma de DNA, de fita dupla de 186 kb, codifica vários genes estruturais e não estruturais usando compartilhamento de organelas das células do corpo humano . A principal porta de entrada é a orofaringe, que também é a porta de saída. Ao entrar ele se replica em células epiteliais e nos linfócitos B, com isso se espalha pelo corpo através destas células B infectadas. Nesta altura, pode gerar sintomas ou não (pacientes assintomáticos). Após esse estágio, dependendo da imunidade de cada paciente, esses mesmos linfócitos B, entram em

um status de latência e são expressos diferencialmente como “imortalizados” (BROZA, HUTT-FLETCHER, 2002; MACSWEEN, CRAWFORD, 2003). Cabe reforçar que, assim como em outros herpes vírus, neste estágio é estabelecida uma “infecção latente no hospedeiro”, aguardando uma oportunidade de reativação (RICKINSON, 2001).

A transmissão do EBV ocorre pela saliva com maior frequência, e com janelas intermitentes, conforme a carga viral. No entanto, já houve relatos de transmissão através de produtos do sangue, transplantes e transmissão sexual. Com essa dinâmica de circulação e transmissão, a prevenção da propagação do vírus, parece um grande desafio (HESS, 2004).

Laboratorialmente a detecção do EBV, seja por sorologias e/ou por exames moleculares de identificação do DNA circulante, merece cuidado, pois a interpretação segue um racional da linha do tempo a partir do início dos sinais e sintomas e o da aplicação da melhor técnica de detecção. Atualmente, ensaios sorológicos são os preferidos, pois apesar do genoma do EBV codificar uma série de genes, os de maior importância para sorodiagnóstico são os que codificam os antígenos do capsídeo viral (VCAs), os antígenos iniciais (EAs) e os antígenos nucleares (EBNAs, 1 e 2), conforme demonstrado na Figura 1.

**Figura 1** – Estrutura do vírus EBV



Fonte: Adaptado de ROSS *et al.*, 2023.

Dos 4 tipos de antígenos do EBV, apenas 3 são amplamente usados comercialmente por fabricantes de kits laboratoriais para interpretação de cada fase do ciclo de atividade, conforme classe de anticorpo, como mostrado na Tabela 1. Já o ciclo de resposta imunológica para o EBV, de acordo com cada classe e tipo de antígeno versus comportamento na linha do tempo está demonstrado na Figura 2.

**Tabela 1** – Ciclo de resposta imunológica, por classe e tipo de antígeno

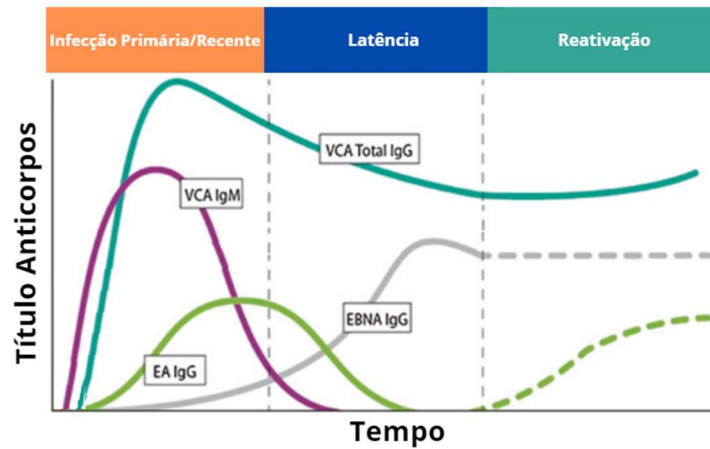
EA IgG	VCA IgM	VCA IgG	EBNA1 IgG	Interpretação
-	-	-	-	SORONEGATIVO
+	-	-	-	INFECÇÃO AGUDA e/ou RECENTE
-	+	-	-	
+	+	-	-	
+	+	+	-	
+	-	+	-	
-	+	+	-	
-	-	+	-	
-	-	+	+	INFECÇÃO PASSADA
-	-	-	+	
++	-	++	+	REATIVAÇÃO
++	+	++	+	

(+) Teste reagente. (++) Teste reagente intenso. (-) Teste não reagente.

Fonte: Adaptado de HESS, 2004.

Já o ciclo de resposta imunológica para o EBV, de acordo com cada classe e tipo de anticorpo versus comportamento de soroconversão e/ou reativação como demonstrado na Figura 2. No soro, podemos observar que numa fase muito inicial da infecção por EBV, é produzida IgM contra o EA. As concentrações máximas de anticorpos tendem a coincidir com o início dos sintomas e, aproximadamente duas semanas após a infecção inicial, começa a produção de IgG contra EA e de IgM, e IgG contra VCA. As concentrações de IgM anti-VCA mais elevadas encontram-se cerca de três semanas após o início dos sintomas. A IgG anti-EA é frequentemente detectável por um período considerável após a infecção. Subsequentemente, as concentrações de IgM anti-VCA e, mais tarde, de IgG anti-EA decrescem. A IgG anti-VCA atinge um pico cerca de seis semanas após o surgimento dos sintomas e o seu nível permanece elevado durante toda a vida. Por volta de três semanas após o aparecimento dos sintomas, começam a ser produzidos anticorpos IgG anti-EBNA1, que constituem um indicador de infecção passada; estes atingem um pico passados cerca de sete meses e permanecem elevados durante toda a vida após uma infecção normal por EBV. A reativação do vírus (tal como a imunossupressão) leva habitualmente a um aumento significativo de anticorpos IgG anti-EA, enquanto os títulos de IgM anti-VCA, raramente aumentam. Após a imunossupressão, a IgG anti-EBNA1 só muito ocasionalmente desaparece, o que a torna um bom marcador de reativação (AALTO, 1998; BAUER, 2001; DOBSON *et al*, 2013; HESS, 2004).

**Figura 2** – Ciclo de resposta imunológica do vírus Epstein-Barr, por classe e tipo de anticorpo versus a linha do tempo no soro



Linha preenchida (presença de títulos de anticorpos). Linha tracejada (presença ou não de títulos de anticorpos).

Fonte: Adaptado de MÜNZ *et al.*, 2015.

Em tempo, cabe ressaltar que para este nosso estudo, o ponto chave a partir daqui é a indicação da “imortalização” dos linfócitos B no corpo humano, que foram infectados pelo EBV. Esse fenômeno pode estar correlacionado, também, como um mecanismo de gatilho para a ativação de autoanticorpos em pacientes com doenças desmielinizantes, que descreveremos mais à frente.

A suspeita de que o desencadeamento da EM seja por uma causa infecciosa, tem sido sugerida por pesquisas recentes (BJORNEVIK *et al.*, 2023), e o EBV, um membro da família do vírus do herpes humano, recorrentemente nos últimos tempos, é citado como potencial implicador do risco, da exacerbação e da progressão da EM (AL-TEMAIMI *et al.*, 2022).

Um dos mecanismos sugeridos para o processo de desmielinização desencadeado pelo EBV, está baseado no mimetismo molecular entre proteínas do EBV (como o EBNA1 que é detectado em quase todos os pacientes com EM antes do início dos sintomas clínicos), com proteínas presentes no SNC. Há forte indicação de que a proteína neste caso seja a GlialCAM. Esta proteína é uma molécula de adesão expressa principalmente nas células gliais do SNC e do fígado (HepaCAM), desempenhando diferentes funções de acordo com a situação. Quando suas funções ficam reduzidas e/ou inexistentes, aumenta a possibilidade de doenças neurológicas (BARRALLO-GIMENO, 2014).

A presença de linfócitos B no LCR de pacientes com EM, ou seja, clones formados a partir da ativação de plasmócitos que sofrem hipermutação somática em resposta ao antígeno apresentado geram anticorpos que são detectados pela presença de bandas oligoclonais no LCR. Outro ponto importante, é que são esses anticorpos formados, que justamente se ligam em uma região do EBNA1. E essa região mimetiza molecularmente a mesma região de ligação da GlialCAM, que está expressa em astrócitos e oligodentrócitos (células da glia). Assim, esse efeito em cadeia, com múltiplos anticorpos de ligação a EBNA1, que são produzidos por clones de linfócitos B, reagem em reação cruzada ao GlialCAM desencadeando a desmielinização no SNC. Dessa forma, basta uma única célula clonal B, no sangue e LCR, para revelar a capacidade de gerar autoanticorpos EBNA1 no rearranjo cruzado com a GlialCAM (LANZ, 2022; ATTFIELD, *et al.*, 2022).

Das várias oportunidades de aplicações de sorologias para o EBV, seja através de anticorpos anti-VCA, anti-EA, e/ou anti-EBNA1, surge uma linha que indica que independentemente de qual estiver aumentado, poderemos ter elevação das concentrações de IgG circulantes para o vírus EBV no LCR de pacientes com EM, quando comparados com amostras de pacientes saudáveis (KYLLESBECH *et al.*, 2022).

## 2.2 ESCLEROSE MÚLTIPLA

A esclerose múltipla (EM) afeta cerca de 2,8 milhões de pessoas no mundo (WALTON, *et al.*, 2020). O Brasil apresenta uma prevalência média de 8,69 casos por 100 mil habitantes, e, assim como no mundo, a prevalência varia de acordo com a região de residência do paciente, sendo menor no Nordeste e maior na região Sul (PEREIRAL, *et al.*, 2015). Corroborando com isso, uma revisão sistemática de 2022, demonstrou maior prevalência de pacientes com EM na região Sul. A cidade de Santa Maria, apresentou 27,2 casos por 100 mil habitantes, enquanto a cidade de Passo Fundo, apresentou 26,4 casos por 100 mil habitantes, ambas no Rio Grande do Sul. Para fins de comparação, a prevalência em Recife, na região Nordeste, foi de 1,4 casos por 100 mil habitantes, reforçando a maior incidência em caucasianos (DOS PASSOS, *et al.*, 2022). As regiões com maior prevalência de EM no mundo estão na América do Norte e na Europa, com latitudes mais altas associadas a uma maior prevalência de EM (WALTON, *et al.*, 2020; SIMPSON, *et al.*, 2019), e apresenta menor

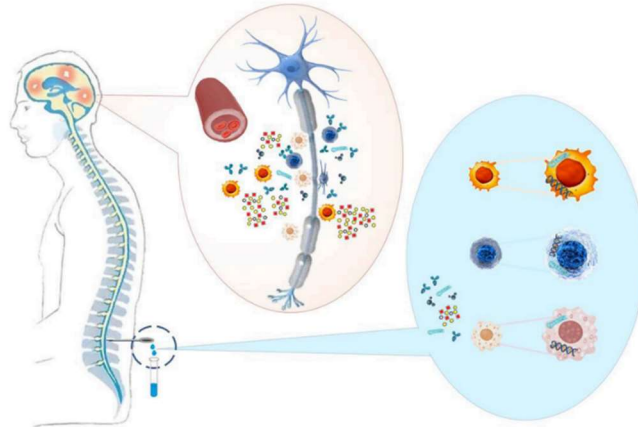
incidência na população afrodescendente, oriental e indígena (ANNIBALI, *et al.*, 2015; OLIVEIRAI, *et al.*, 1998). O início dos sintomas geralmente ocorre entre 20 e 30 anos de idade, e as mulheres têm três vezes mais probabilidade de desenvolver a EM do que os homens (REVITAL *et al.*, 2022). A proporção média esperada a cada 3 pacientes, é de 2 para sexo feminino e 1 para sexo masculino (2:1) (WHO, 2008). Em um estudo nacional recente a idade média dos pacientes em investigação para doenças desmielinizantes foi de 40 ( $\pm$  14,2) anos (DOMINGUES, *et al.*, 2024).

A EM é uma doença inflamatória crônica e neurodegenerativa e é causada pelas células imunológicas que atacam os neurônios como se fossem corpos estranhos (ALANIZI, *et al.*, 2022). Isto significa que o sistema imunológico, que normalmente funciona contra infecções, passa a atacar o SNC, como acontece contra os vírus e as bactérias (MOHAMMEDI, 2021). Este processo leva a uma desmielinização neuronal, a degeneração de axônios, a perda sináptica no cérebro e medula espinhal (ME) (WALTON, *et al.*, 2020). Adicionalmente, também há perda de oligodendrócitos e gliose de astrócitos, produzindo áreas ou regiões de lesões de placas e/ou de esclerose, podendo ser únicas/isoladas ou múltiplas (KUNKL *et al.*, 2020). Cabe destacar que a desmielinização é o termo que descreve uma perda da mielina, da bainha de mielina do neurônio, com uma relativa preservação, ou não, do axônio (LOVE, 2006), e NÃO é exclusiva da EM.

As manifestações clínicas dos pacientes são variáveis, na forma aguda ou crônica, como: fadiga, dificuldades de locomoção, dormência ou formigamento, espasticidade, fraqueza, problemas de visão, tontura e vertigem, problemas de bexiga, problemas sexuais, problemas intestinais, dor e coceira, mudanças cognitivas, mudanças emocionais, depressão, problemas de fala e para engolir, de forma isolada ou em combinação (MOHAMMEDI, 2021; GAJOFATTO *et al.*, 2015; BRASIL, 2015).

Na fisiopatologia microscópica, temos a presença de células imunológicas, de anticorpos, de moléculas de adesão, de citocinas, de quimiocinas, e dos ácidos nucléicos, que refletem as inflamações isoladas ou múltiplas que levam a uma neurodegeneração em uma linha do tempo (Figura 3). O LCR também apresenta características importantes que serão descritas, no decorrer do texto, como a avaliação da barreira hemato encefálica (BHE), síntese intratecal e a avaliação das bandas oligoclonais (BOC) (DEISENHAMMER, *et al.*, 2019).

**Figura 3** – Neurodegeneração na esclerose múltipla e respostas inflamatórias avaliadas na coleta do líquido cefalorraquiano



Regiões afetadas no SNC pelos processos inflamatórios com desmielinização com participação de plasmócitos (linfócitos B). As alterações podem ser detectadas através da coleta do LCR na região lombar para análise de células e proteínas.

Fonte: Adaptado de DEISENHAMMER *et al.*, 2019.

O perfil celular tecidual em pacientes normais, neurologicamente saudáveis, em regiões parenquimatosas do cérebro e/ou medula espinhal, tanto na substância branca como na cinzenta (SCHWARTZ, *et al.*, 2023), apresentam oligodentrócitos (81%), células imunológicas, astrócitos, oligodentrócitos progenitores (OPC), e as células associadas ao revestimento de vasos. Este perfil é considerado de fase “homeostática”, neurologicamente normal, quando comparado a pacientes com EM. Estes apresentam regiões de desmielinização, com inflamações, e com perfil celular apresentando: oligodentrócitos (89%), infiltrados de células imunológicas como: linfócitos TCD4 e TCD8 ativados, plasmoblastos/plasmócitos (CD38, IGHG1, IGHA, IGHM, não expressando MS4A1), monócitos (expressando predominantemente CD14) e células dendríticas maduras (CD83, NFKB1), sugerindo um plano imunomediado ativo, de apresentação de antígenos ao sistema imunológico (ABSINTA, *et al.*, 2021).

Presente tanto nos infiltrados de tecido nervoso observados ao microscópio, quanto como células circulantes no LCR, as células plasmáticas (linfócitos B ativados) são os principais atores na patogênese da EM (FRAUSSEN, 2009; BOGERS, 2023). Em oposição, estas células raramente são observadas e detectadas em pacientes neurologicamente saudáveis, mas estão presentes em pacientes com EM. Estes clones expandidos de linfócitos B são produzidos localmente, sendo os responsáveis



pela síntese intratecal e pela formação das bandas oligoclonais (BOC) observadas em mais de 90% dos pacientes com EM (FRAUSSEN, 2009). No Brasil a frequência da presença da BOC é menor quando comparado a países de origem caucasiana e similar a países de origem não caucasiana, como observado em outros 3 estudos nacionais já publicados com taxas de presenças de BOC de 85%, 54,4%, e 44,4% (SHOLER, *et al.*, 2001; GAMA, *et al.*, 2009; DOMINGUES, *et al.*, 2024).

Com isso entendemos que o mecanismo da cascata imunomediada está mais bem esclarecida, entretanto a etiologia e/ou gatilho que levam a desencadear todo esse processo da doença ainda não é claro (PARODI, *et al.*, 2021). Existem alguns fatores de risco que são mais associados com início da EM, incluindo certos fatores genéticos, baixas concentrações de vitamina D, reduzida exposição solar, a infecção pelo EBV, além do tabagismo (REVITAL, *et al.*, 2022).

As células B “virgens” são caracterizadas pela expressão de diferenciação em geral com CD20 e CD19, e pela ausência do CD27 e CD38 em sua superfície quando são liberados no sangue periférico, na medula óssea (MO) e nos órgãos linfoides secundários. Já em circulação, quando são apresentados a um antígeno, desencadeiam a sua ativação, expressando CD80 e CD86. Depois da ativação são produzem anticorpos plasmáticos de baixa afinidade, com uma regulação de expressão de CD38. Assim, surgem as células B de memória que expressam CD19 e CD27, e que são capazes de reativar e diferenciar-se muito rapidamente quando novamente em contato com a antígeno inicial, surgindo a expressão do CD138. Quando as células B se tornam de vida longa, “alta afinidade”, produzindo anticorpos de alta afinidade, ela perde a expressão do CD20, ficando CD19 variável, e mantém o CD27, CD38 e o CD138 (FRAUSSEN, 2009; BOGERS, 2023).

Assim, os linfócitos B que circulam no LCR em indivíduos neurologicamente saudáveis, na sua grande maioria, são do tipo “virgens” e raramente são detectados linfócitos B do tipo “alta afinidade” (FRAUSSEN, 2009). A virada de “chave” do aumento desproporcional de linfócitos B de alta afinidade frente a “virgens” no SNC, durante a progressão da EM, é justificada pela presença da síntese intratecal e pela presença de BOC.

Assim, o diagnóstico da EM se torna muito complexo, e multifatorial, uma vez que não existe marcador ou teste diagnóstico específico. Ao longo da evolução da medicina, vários modelos foram tentados, esquematizados e propostos, a fim de orientar e facilitar o diagnóstico dessa doença. Atualmente, são os critérios de

McDonald, revisado em 2017, que são mais frequentemente utilizados na medicina (Quadro 1) (THOMPSON, 2018).

**Quadro 1** – Critérios de Macdonald para diagnóstico de esclerose múltipla

Número de surtos <sup>(a)</sup>	Número de lesões com evidência clínica objetiva <sup>(b)</sup>	Crítérios adicionais para o diagnóstico de EM
2 ou mais surtos	2 ou mais lesões	Nenhum <sup>(c)</sup>
2 ou mais surtos	1 lesão + evidência clara de surto anterior envolvendo uma lesão em localização anatômica distinta	Nenhum <sup>(c)</sup>
2 ou mais surtos	1 lesão	Disseminação no espaço demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Novo surto em localização diferente no SNC</li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Ressonância Magnética<sup>(d)</sup></li> </ul>
1 surto	2 ou mais lesões	Disseminação no tempo demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Novo surto</li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Ressonância Magnética<sup>(e)</sup></li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Presença de bandas oligoclonais no líquido<sup>(f)</sup></li> </ul>
1 surto	1 lesão	Disseminação no espaço demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Novo surto em localização diferente no SNC</li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Ressonância Magnética<sup>(d)</sup></li> <li style="text-align: center;">E</li> </ul> Disseminação no tempo demonstrada por: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Novo surto</li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Ressonância Magnética<sup>(e)</sup></li> <li style="text-align: center;">OU</li> <li>• Presença de bandas oligoclonais no líquido<sup>(f)</sup></li> </ul>

(a) Definição de surto constantes pode ser consultada: BRASIL, 2015; (b) O diagnóstico baseado em evidência clínica objetiva de duas lesões é o mais seguro. Evidência histórica de um surto prévio, na ausência de achados neurológicos objetivamente documentados, pode incluir eventos históricos com sintomas e evolução característicos de um evento desmielinizante inflamatório prévio. Pelo menos um surto, entretanto, deve ter seu suporte em achados objetivos. Na ausência de evidência objetiva residual, é necessária cautela; (c) Nos critérios de McDonald originais (revisão de 2017), não são necessários testes adicionais, entretanto, para efeito deste PCDT adotou-se que qualquer diagnóstico de EM deve ser realizado com acesso à neuroimagem. (d) Ressonância Magnética para DIS conforme descrito na seção "Diagnóstico" deste PCDT (e) Ressonância Magnética para DIT conforme descrito na seção "Diagnóstico" deste PCDT (f) A presença de bandas oligoclonais no líquido não demonstra DIT, contudo pode substituir a demonstração de DIT.

EM = Esclerose Múltipla; SNC = Sistema Nervoso Central; LCR = Exame do líquido cefalorraquidiano; IgG = Imunoglobulina G, DIT = Disseminação no Tempo, DIS = Disseminação no Espaço, PCDT = Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas.

Fonte: Adaptado de SCHÜNEMANN, 2019 e THOMPSON *et al.*, 2018.

Em geral, o diagnóstico é baseado na documentação de dois ou mais episódios sintomáticos, que devem durar mais de 24 horas e ocorrer de forma distinta, separados por período de no mínimo um mês, ou seja, disseminados no tempo e no espaço. Exames radiológicos e laboratoriais, em especial a RM e exames no LCR, podem em conjunto com a clínica, serem essenciais para compor o diagnóstico e excluir outras doenças de apresentação semelhante e/ou mimetizantes (BRASIL, 2015; REVITAL, *et al.*, 2022; SCHÜNEMANN, 2019).

Como a apresentação clínica do paciente com EM nem sempre é linear, (podendo ocorrer surtos ou ataques agudos, intercalados com períodos de remissão espontânea dos sintomas ou pelo uso de corticosteroides), é importante que se realize os exames laboratoriais de sangue e LCR antes de qualquer intervenção medicamentosa. Para tal, a interação do laboratório com a equipe médica, na condução em uma linha do tempo, evita falsos resultados laboratoriais causados pelo uso antecipado e precipitado de corticosteroides (SILVA, 2021; GAJOFATTO *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2012; BRASIL, 2021).

### 2.3 DISTÚRBIO DO ESPECTRO DA NEUROMIELITE ÓPTICA (NMOSDSD)

A inflamação do nervo óptico desmielinizante, conhecida como distúrbio do espectro da neuromielite óptica (NMOSD), tem como principal causa a EM. Além disso, as doenças associadas a anticorpos contra a proteína da mielina do oligodendrócito (anti-MOG), e outras patologias inflamatórias raras também estão associadas a inflamação do nervo óptico desmielinizante (OPITC NEURITIS STUDY GROUP, 2008; COBO-CALVO, 2018; RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2022).

A NMOSD, anteriormente era considerada um subtipo de EM, porém, atualmente é uma entidade separada em diagnóstico e tratamento (SIRIRATNAM, 2023). Em países ocidentais, a EM é a primeira causa de NMOSD, e até 70% dos pacientes com EM sofrerão pelo menos uma NMOSD durante o curso da doença (RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2022).

Um ponto importante é que 60% dos pacientes com NMOSD terão resultados positivos para anti-aquaporina 4 (anti-AQP4) e o restante, cerca de 40%, serão positivos para anti-MOG, no distúrbio associado a glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOGAD) (KIM, 2015; COBO-CALVO, 2018; RODRIGUEZ-ACEVEDO, 2022). A Aquaporina 4 (AQP4) é um componente do complexo da

proteína distroglican localizado no astrócito que faz parte da barreira hemato líquórica (BHL) (PITTOCK, 2006; TAKAHASHI, 2006).

A idade média de início da NMOSD é de 40 anos. No entanto, existe uma grande variedade de casos pediátricos e de início tardio, que representam cerca de 20% de todos os pacientes. A NMOSD com anti-AQP4 reagente, tem uma forte preponderância feminina para masculina, de até 9:1, o que é muito maior do que na EM, ou não reagentes para NMOSD. O anti-AQP4 está presente na maioria dos pacientes, mas este número é provavelmente subestimado, uma vez que muitos estudos anteriores incluíram a MOGAD como parte da NMOSD quando os resultados eram não reagentes (JARIUS, 2020; SIRIRATNAM, 2023).

A patogênese da NMOSD surge de um gatilho desconhecido, assim como na EM, e leva à produção de anticorpos anti-AQP4, a partir de populações de linfócitos B (WINGERCHUK, 2006). Um ponto interessante nesse caso é que os linfócitos B, que atuam ativamente na doença tem a presença da expressão do CD19, do CD27 e do CD38, mas por algum motivo se mantém com um padrão de clones de baixa afinidade, com expressão de CD25, “virgens” (HOSHINO, 2020). A presença de clones “virgens” ativos é reforçada na observação em análise dos exames do LCR, por apresentarem resultados de BOC, na grande maioria dos casos, negativos, e com ausência de bandas bem como a ausência da síntese intratecal (JARIUS, 2011).

#### 2.4 DOENÇA DO ANTICORPO CONTRA GLIPROTEÍNA DO OLIGODENTRÓCITO (MOGAD)

A doença do anticorpo da glicoproteína associada ao oligodendrócito da mielina (MOGAD), apresenta similaridade com a NMOSD (SITITHO, 2023). Assim, como a NMOSD, a MOGAD, também gera inflamação e desmielinização do nervo óptico, e agora é reconhecida como uma entidade nosológica com características clínicas e paraclínicas específicas para auxiliar no diagnóstico precoce (WYNFORD-THOMAS, 2019).

A glicoproteína associada ao oligodendrócito da mielina (MOG) é uma proteína transmembrana encontrada na superfície do SNC e está ligada a presença de oligodendrócitos maduros, constitui apenas uma pequena porção da mielina, cerca de 0,05%, e suas possíveis funções são de estabilidade. O uso de anticorpos anti-MOG e a detecção de altos títulos têm sido relatadas em várias doenças desmielinizantes,

incluindo a neurite óptica, mielite transversa, encefalomielite disseminada aguda (ADEM) e a encefalite cortical cerebral. Entretanto, o uso do anti-MOG tem sido importante na complementação do diagnóstico diferencial do NMOSD e da EM (CORBALI, 2023).

Embora nenhuma faixa etária esteja isenta, a idade média de início é na quarta década de vida, sendo a neurite óptica o fenótipo de apresentação mais frequente. Parece ser mais frequente em pacientes com menos de 18 anos e a proporção por gênero é de 1:1 (SECHI, 2022). O curso da doença pode ser monofásico ou recidivante, com recidivas subseqüentes envolvendo mais comumente o nervo óptico. Incapacidade residual desenvolve-se em 50-80% dos pacientes, sendo a mielite transversa no início o preditor mais significativo do resultado a longo prazo (WYNFORD-THOMAS, 2019).

## 2.5 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O exame do líquido cefalorraquidiano (LCR) ou é um fluido composto de 99% de água e 1% de proteínas, íons, neurotransmissores e glicose (BULAT, 2011). Ele preenche os espaços circundantes do SNC, e sustenta, protege e "irriga" todo o sistema das leptomeninges, principalmente removendo substâncias tóxicas. Um homem adulto possui cerca de 150 mL de LCR circulante, sendo que, 17% nos ventrículos, e o resto perfunde entre as cisternas e o espaço subaracnóideo que é o espaço real entre as meninges aracnóide e a pia-máter, as chamadas leptomeninges. Classicamente, o fluxo do LCR segue uma velocidade impulsionada pelos batimentos cardíacos. Cerca de 75% do LCR é produzido pelo epitélio do plexo coróide e 25% surgem de outras estruturas, como a parede ependimal, o parênquima cerebral e o líquido intersticial da troca sangue/LCR (ROMAGNOLI, *et al*, 2019).

A elegibilidade para indicação da coleta do LCR segue critérios clínicos bem estabelecidos, e dentre elas estão o apoio no estadiamento de doenças oncológicas, no seguimento de alterações vasculares (vasculites cerebrais), em sangramentos, em doenças desmielinizantes, em quadros demenciais, em infecções agudas (meningites), em infecções subagudas, em infecções crônicas, em processos inflamatórios (reacionais e autoimunes) e na infiltração de células neoplásicas (tumores sólidos e hematológicos) que acometem o SNC e o sistema nervoso periférico (SNP) (LIVRAMENTO *et al*, 2002).

Outra abordagem importante que envolve o LCR é a possibilidade da administração intratecal de medicamentos e quimioterápicos, tanto para o tratamento de infecções quanto para tumores primários ou metastáticos do SNC, e, ainda, como profilaxia do envolvimento neurológico de tumores sistêmicos, por exemplo, em leucemias (COSTA NETO *et al*, 2009).

Na EM, além da rotina básica do LCR, com análise física, do quimiocitológico (contagem global, contagem citológica diferencial, dosagem de glicose, dosagem de proteínas), coloração de Gram, pesquisa de fungos, VDRL, devemos incluir, marcadores de síntese intratecal, como o índice de anticorpos, o reibergrama, o índice de IgG e a BOC (DEISENHAMMER, *et al.*, 2019; COSTA NETO, 2015).

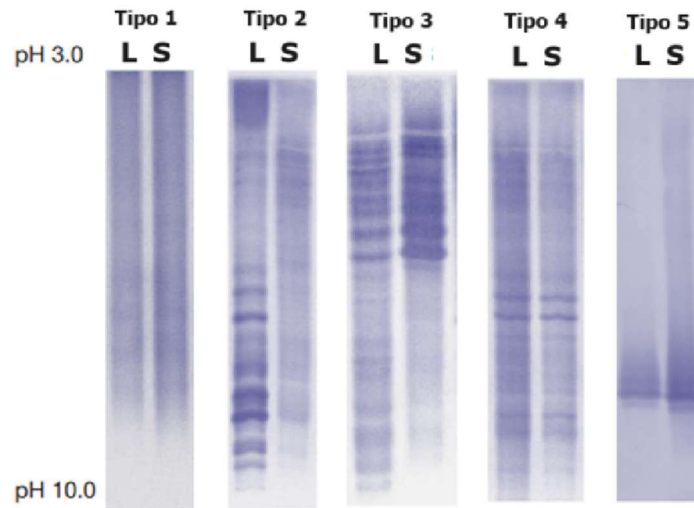
É importante ressaltar que a técnica para pesquisa da BOC por métodos tradicionais usando gel de agarose e/ou de poliacrilamida como meio de separação não tem poder de resolução para interpretação na EM, sendo extremamente limitada. Neste caso, a técnica “padrão ouro” para BOC é por isoeletrofocalização (IEF), que resulta de uma corrida eletroforética, de um estado igual do ponto isoelétrico da proteína e o pH do dielétrico anfotérico do meio de separação de poliacrilamida. Assim, esse método de separação da proteína se torna mais sensível e diversificado. Além disso, a imunofixação ou o *western blotting* (WB) são adicionados usando anticorpos anti-IgG (ou IgA/IgM), marcados com enzima para identificar componentes e subclasses de anticorpos das bandas, onde o resultado pode ter 5 (cinco) padrões estabelecidos. É considerado um padrão positivo quando apresenta 2 ou mais bandas no LCR quando comparadas ao soro, em corrida pareada (Figura 4) (COSTA NETO, 2015; DEISENHAMMER, *et al.*, 2019; JIN, *et al*, 2023).

## 2.6 BARREIRA HEMATO ENCEFÁLICA (BHE)

A BHE é o limite físico (anatômico) e bioquímico entre a corrente sanguínea e o parênquima no SNC. Ela é composta por células endoteliais vasculares fortemente ligadas, rodeadas por uma membrana basal e sustentadas por astrócitos, pericitos e da micróglia (Figura 5). Além disso, a BHE tem uma função vital de proteger o SNC de vírus, bactérias e neurotoxinas, ou seja, de toda e qualquer enfermidade, controlando o movimento de íons, de moléculas e de células entre o sangue e o SNC. Assim, ela consegue impedir que 98% dos medicamentos de moléculas pequenas e

100% dos medicamentos de moléculas grandes entram no SNC através da corrente sanguínea diretamente, sendo extremamente seletiva e protetiva (NEJM, 2023).

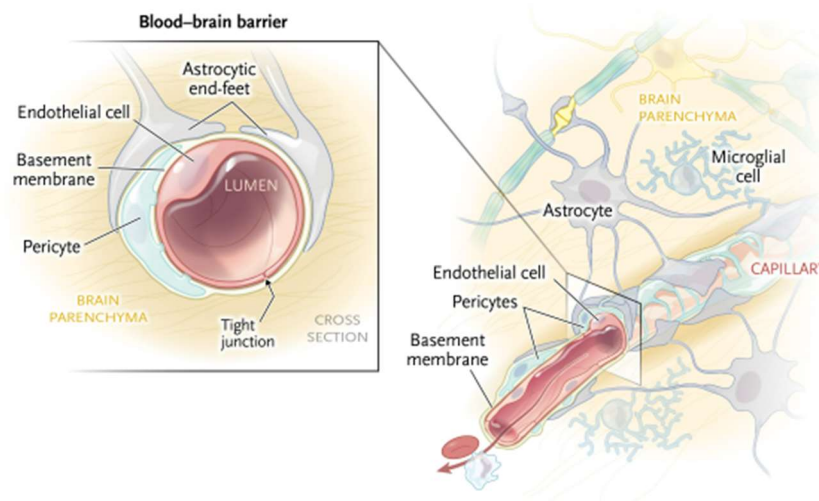
**Figura 4** - Perfis de resultados do exame de pesquisa de Bandas Oligoclonais IgG



L: Líquor e S: Soro. Cinco padrões típicos de BOC com isoeletrofocalização e imunofixação ensaio. **Tipo 1:** negativo/normal: ausência de BOC no líquido e soro; **Tipo 2:** positivo/específico do líquido: BOC no líquido; **Tipo 3:** positivo/mais no líquido: BOC adicional no líquido; **Tipo 4:** identicamente positivo: BOCs idênticos no líquido e no soro; **Tipo 5:** monoclonal: padrão monoclonal idêntico.

Fonte: Adaptado de JIN, 2023.

**Figura 5** - Ilustração da barreira hemato encefálica (BHE)



Os capilares do tecido cerebral estão revestidos pelos astrócitos (*astrocyte*), pelas células da microglia (*microglial cell*) e quando visualizamos na imagem ampliada temos a ilustração da barreira hemato encefálica (*blood-brain barrier*) vista no corte anatômico (*cross section*) que destacam os pés dos astrócitos (*astrocytic end-feet*), as células endoteliais dos vasos sanguíneos (*endothelial cell*), a membrana basal (*basement membrane*), o pericitio (*pericyte*), a junção estreita (*tight junction*) inseridos no tecido cerebral (*brain parenchyma*).

Fonte: Adaptado de New England Journal of Medicine (NEJM) Illustrated Glossary - 2023.

Com isso a partir da troca sangue-LCR, a BHE tem um papel de atuar dinamicamente para manter o ambiente metabólico do SNC e do LCR. Além disso, a sua atividade garante, em condições normais, as diferenças na composição citológica, imunológica e bioquímica do LCR em relação à composição do sangue. Por sua vez, a composição do LCR depende das condições sanguíneas e do equilíbrio sangue-LCR, e, portanto, espera-se a presença de componentes presentes no soro, porém em concentrações diferentes (SPECTOR *et al.*, 2015).

Em relação à concentração bioquímica absoluta, destacam-se principalmente as de proteínas, células e marcadores tumorais no LCR com diversos fatores envolvidos, dentre eles:

- a dependência da concentração plasmática.
- a integridade da BHE.
- a velocidade do fluxo do LCR.
- dos pesos moleculares.
- do raio hidrodinâmico das moléculas.

Assim, os estudos do fluxo liquórico se baseiam nesses fatores e essas informações nos levam a concluir que as teorias das relações de troca da BHL e da BHE não são somente virtuais. Com esse raciocínio, ficou estabelecido que, em condições normais, as concentrações de proteínas, principalmente de células e da albumina, podem variar conforme a idade, e no caso da albumina há uma tendência de aumento de concentração após o avanço da idade (REIBER, *et al.*, 1994).

O funcionamento da BHL é fortemente influenciado pela velocidade do fluxo do LCR. Assim um fluxo de LCR reduzido irá causar uma disfunção causada por uma formação reduzida ou bloqueio de drenagem, e como a albumina só é sintetizada no fígado, todas as moléculas detectadas no LCR são resultado da troca sangue e LCR. Como resultado, o quociente de albumina ( $Q_{alb}$ ) pode ser usado como uma medida do funcionamento da BHL (REIBER, *et al.*, 2001).

Portanto, se for detectado no LCR um valor aumentado de albumina em relação ao valor de referência no soro, isso é um indicador de disfunção da barreira. O  $Q_{alb}$  tem seu range mínimo dos quatro meses aos cinco anos de idade, e depois aumenta continuamente devido ao avanço da idade. Posteriormente, volta a declinar a partir dos 60 anos de idade pelo processo de envelhecimento (ZIMMERMANN, *et al.*, 2012).

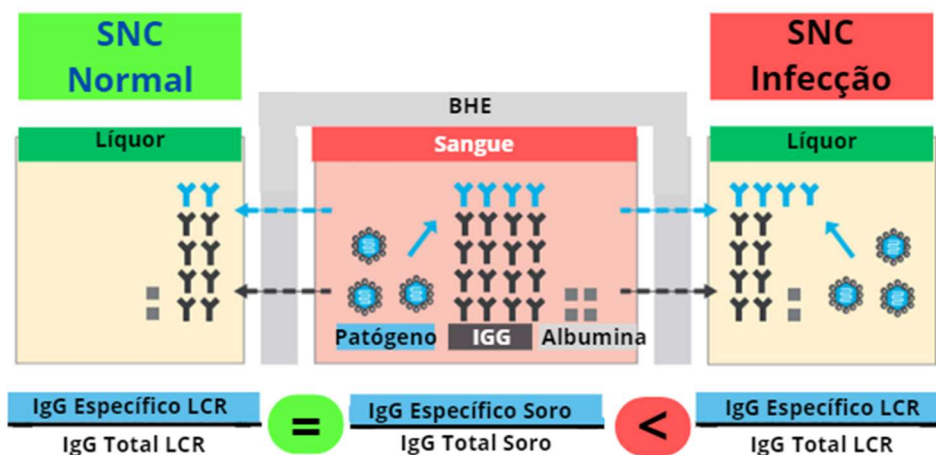


Associado ao  $Q_{alb}$ , outro ponto importante é a quantificação das imunoglobulinas e proteínas inflamatórias presentes, pois o aumento delas pode ser, também, devido a produção intratecal. Isso é muito importante no auxílio diagnóstico de diversas doenças neurológicas, especialmente para investigações autoimunes, como no caso das doenças desmielinizantes (ROSTASY, *et al*, 2003).

## 2.7 ÍNDICE DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS (IAE)

O IAE é o cálculo que é útil para confirmar uma suspeita de infecção, principalmente no caso do SNC, e busca evidenciar a síntese local de anticorpos específicos ou não (SHAMIER, *et al.*, 2021). Durante um processo infeccioso, a reação imunológica no LCR com a resposta imune humoral gera a síntese intratecal sendo oligoclonal poliespecífica, e por isso o uso da relação Líquor/soro se torna importante para detectar de uma maneira mais sensível o aumento intratecal de seja para IgG, IgA ou IgM (BARRIOS-LAMOTH, *et al.*, 2019). Entretanto, a simples razão linear, com cálculo LCR/soro, parece não ser suficiente para uma definição real, e isso será descrito a frente. O modelo de razão simples para o cálculo do IAE está esquematizado na Figura 6.

**Figura 6** - Mecanismo Índice de Anticorpos Específicos (IAE)



Se houver uma infecção do sistema nervoso central (SNC), anticorpos específicos para patógenos também serão formados no líquido (LCR). Consequentemente, a sua proporção no LCR aumenta em contraste com a do soro. A produção intratecal de anticorpos específicos para patógenos é definida pelo IAE. O quociente é calculado a partir da quantidade de anticorpos IgG específicos com a IgG total do LCR em proporção à quantidade de anticorpos IgG específicos com a IgG sérica total.

Fonte: Adaptado de CSF Diagnosis Manual, Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, 2023.

O modelo da Figura 6, não inclui a relação com o  $Q_{alb}$  no cálculo da determinação do conteúdo total de anticorpos oligoclonais e na atividade específica de anticorpos do LCR, que também deve ser comparada com o soro para conseguirmos distinguir um anticorpo intratecal a partir da determinação de anticorpos de origem sorológica (sangue). Por esta razão o quociente de anticorpo específico  $Q_{spec. IgX}$  deverá ser calculado conforme fórmula abaixo:

$$Q_{spec. IgX} = \frac{[spec IgX_{LCR}]}{[spec IgX_{Soro}]}$$

$Q_{spec. IgX}$  S (Quociente específico por classe de anticorpo); IgX (Classe anticorpo avaliada, exemplo: IgG, ou IgM, ou IgA)

O objetivo do quociente acima é devido a possibilidade da disfunção da BHL poder ser a causa do aumento da atividade de anticorpos específicos detectados, o  $Q_{spec. IgX}$ . E por isso, o  $Q_{spec. IgX}$  deve ser utilizado como um marcador para avaliar a função de barreira para evitar uma interpretação errada do uso linear de  $Q_{alb}$ . O quociente a partir de IgX ( $Q_{IgX}$ ) derivado do IgX concentração no LCR e o valor dosado no soro é usado como base para a função direta da BHL. Em indivíduos saudáveis, a proporção sérica de IgX específica no LCR é idêntica à proporção dos anticorpos IgX totais. Por esta razão o  $Q_{IgX}$  pode ser usado como referência e por isso substitui o  $Q_{Alb}$  linear como parâmetro de barreira. Com isso o cálculo para o método de construir o IAE deve ser:

$$IAE = \frac{[Q_{spec. IgG}]}{[Q_{IgG total}]}$$

Proporcionalmente, o  $Q_{spec. IgX}$  na ausência de condições patológicas, ou seja, apresenta uma equivalência do quociente para todas as classes anticorpos, e o valor esperado de IAE é de 1,0 em indivíduos saudáveis. Já a atividade específica do anticorpo no LCR aumentará na presença de síntese intratecal seja IgG, IgA e/ou IgM, e assim teremos o aumento do  $Q_{spec.}$  e valores de IgX. Inicialmente a síntese intratecal de anticorpos poderá aumentar apenas ligeiramente para o anticorpo total em atividade no LCR, mas o  $Q_{IgX}$  permanecerá quase inalterado. E por isso na sequência, a IAE poderá aumentar e servirá como um marcador para síntese intratecal de anticorpos de maneira real. Devido a possíveis imprecisões e variações na determinação dos analitos dosados, os valores do IAE entre 0,7 e 1,4 são

normalmente interpretados como achados recorrentes esperados, enquanto um valor de IAE superior a 1,5 é geralmente avaliado como patológico (ZIMMERMANN, *et al*, 2012; REIBER, *et al*, 1998; REIBER, *et al*, 2001).

Portanto, conforme já descrito, o cálculo do valor IAE de  $Q_{IgX}$  pode ser usado como uma medida da BHL em vez de  $Q_{Aib}$  linear. Com isso, podemos mensurar quantitativamente quando há uma forte estimulação, reativação, seja fraca ou forte, poliespecífica ou não, de clones de linfócitos B (plasmócitos) em uma condição patológica no SNC. Quando há uma extensa síntese intratecal específica de anticorpos teremos também o aumento da atividade de anticorpos totais no LCR. Como resultado, o  $Q_{IgX}$  aumenta significativamente e perde o seu significado como um marcador para a barreira sanguínea do LCR, porque uma distinção entre difusão e síntese intratecal não será mais possível. No entanto, se o  $Q_{IgX}$  aumentado for usado para cálculo, o índice de anticorpos será reduzido, o que pode induzir a erros de resultados de pacientes não doentes. Por esta razão, o cálculo do IAE com uma estimulação forte ou poliespecífica não é baseada no  $Q_{IgX}$ . A faixa normal superior  $Q_{Lim IgX}$  é usada em vez disso, o que representa o máximo de  $Q_{IgX}$  ocorrendo em pessoas saudáveis. Por isso o uso do  $Q_{Lim IgX}$  elimina a possibilidade de uma síntese intratecal induzir o erro no marcador da função da BHL. Este efeito pode ser ignorado na ausência de uma estimulação forte ou poliespecífica (ZIMMERMANN, *et al*, 2012; REIBER, *et al*, 1998; REIBER, *et al*, 2001). Como resultado, dois casos devem ser distinguidos no cálculo do IAE:

$$\text{a) } IA = \frac{[ Q_{spec IgG} ]}{[ Q_{IgG total} ]} \quad \text{b) } IA = \frac{[ Q_{spec IgG} ]}{[ Q_{Lim IgX} ]}$$

Já para Wilsemann e colaboradores (2010), a razão de normalidade esperada, líquido/soro para IAE, fica entre 0,7 e 1,3, e valores acima de 1,5 podem ser considerados como clinicamente relevantes, indicando estados patológicos. Os resultados com ponto de corte inferior a 0,6, teoricamente não são esperados, mas são particularmente prováveis de ocorrer em reações poliespecíficas, e geralmente não tem significado clínico. Já valores superiores a 4,0 podem ser considerados imprecisos quantitativamente, devido aos níveis de titulação e linearidade. Os valores superiores a 2,5 podem ser interpretados como definitivamente patológicos. Barrios-Lamoth e colaboradores (2019), reforçam a recomendação de que o cálculo da IAE, apresenta maior sensibilidade quantitativamente, e é claramente demonstrada

quando temos um índice maior ou igual a 1,5 o que indica clinicamente a síntese intratecal. Entretanto, outros autores sugerem que, em vez de 2,5, devemos ampliar a razão de IAE para 3,0 no sentido de consolidar a avaliação como definitivamente patológicos (SHAMIER, *et al.*, 2021; DUSSAIX *et al.*, 1987; DE GROOT-MIJNES *et al.*, 2006). Assim ajustamos os valores de interpretação para o IAE, os quais estão apresentados de forma simplificada na Figura 7.

**Figura 7** - Valores de interpretação para o Índice de Anticorpos Específicos (IAE)

IAE	INTERPRETAÇÃO
< 0,6	Sem significado clínico
0,7 a 1,4	Normalidade
> 1,5	Clinicamente relevante
> 2,5	Definitivamente patológico

Fonte: Adaptado de WILSEMANN, 2010; ZIMMERMAN, 2012; DE GROOT-MIJN, 2006.

## 2.8 REIBERGRAMA

Por muito tempo a determinação de proteínas do LCR e sangue, em particular as imunoglobulinas e albumina, foi utilizada no apoio diagnóstico de doenças, mas sendo controverso. Vários modelos foram lançados na busca de um entendimento de todas as variáveis da troca sangue-LCR, mas sem muito sucesso, pois não contemplavam o todo da fisiologia da BHE e da anatomia do SNC (COSTA NETO, 2015). A maioria desses modelos se baseava em cálculos lineares usando a relação (razão simples) da concentração no LCR pela concentração no sangue. Outros tentaram estabelecer abordagens não lineares com cálculos de funções sigmoidais e exponenciais, entretanto, em determinado momento havia áreas de resultados não correlacionadas entre a clínica dos pacientes e as alterações no LCR em resultados analíticos (REIBER, 2001).

Assim, surgiu a mais aceita aplicação, do estudo da BHE e BHL, usando os normogramas de Reiber, atrelados as funções da teoria da difusão molecular ↔ fluxo do LCR, contemplando integralmente a fisiologia líquórica: da velocidade, da idade do

paciente, da área de troca tecidual LCR/sangue ao longo do espaço subaracnóideo, do peso molecular e do raio hidrodinâmico das moléculas (REIBER, 1994).

Basicamente, os normogramas de Reiber, conseguem estabelecer, com uma sensibilidade muito próxima da realidade *“in vivo”*, a dinâmica das relações de concentrações de moléculas, sendo que, há como garantir se elas são provenientes do sangue e chegando ao LCR e/ou se estão sendo produzidas somente no SNC. Este marco do conhecimento foi o grande salto para diagnóstico diferencial de muitas doenças autoimunes, infecciosas e oncológicas, tornando o LCR vital no apoio diagnóstico (REIBER, 2003).

A aplicação prática foi demonstrada a partir daquele momento. Foi possível estabelecer avaliações importantes para:

- Síntese intratecal de IgG.
- Síntese intratecal de IgM.
- Síntese intratecal de IgA.
- Separação derivativa de frações originárias do LCR e do sangue a partir da albumina.

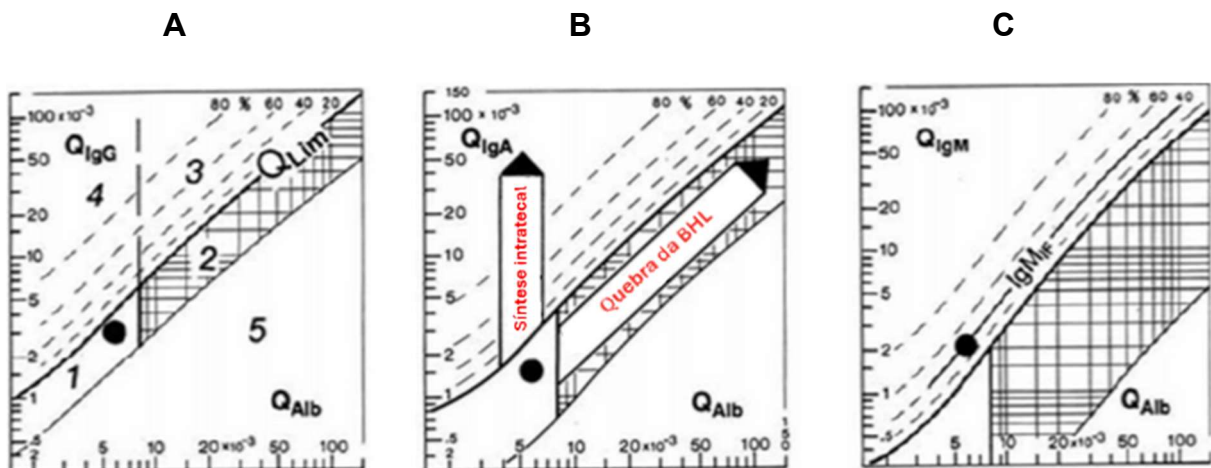
A construção prática dos normogramas levaram anos e após centenas de milhares de amostras e pacientes, foram validados, matematicamente, biologicamente e estatisticamente para a prática laboratorial diária de 3 (três) modelos de aplicações, conforme ilustradas na figura 8, com 5 (cinco) regiões de interpretação (REIBER, 2003).

Os modelos de normogramas estão apresentados nas Figuras, 8A, 8B e 8C. Os intervalos de referência das frações IgG, IgA e IgM, somadas às proteínas derivadas do sangue presentes no LCR (intervalos 1 e 2), são representados pelo espaço entre as linhas de discriminação hiperbólica superior ( $Q_{Lim}$ ) e hiperbólica inferior onde ficaram localizados 99% dos resultados dos 4300 pacientes investigados. A curva hiperbólica superior (linhas grossas) do intervalo de referência representa a linha de referência  $Q_{Lim}$  entre as concentrações de proteínas derivadas do cérebro e aquelas do sangue. Valores acima de  $Q_{Lim}$  representam frações intratecais em porcentagem da concentração total no LCR definidas como frações intratecais de IgG, de IgA e de IgM (REIBER, 1994).

Essas frações intratecais podem ser lidas de maneira conveniente e direta nas linhas tracejadas de 10, 20, 40, 60 e 80%, acima da  $Q_{Lim}$ . Na Figura 8C está demonstrada uma fração intratecal de IgM na faixa de 40% ( $IgM_{FI}$ ), representado pelo

círculo preenchido preto (●). Isso indica que existe uma produção intratecal de IgM e sem quebra da BHL.

**Figura 8** - (A) Modelo do normograma para imunoglobulina (Ig) G; (B) Modelo do normograma para IgA; (C) Modelo do normograma para IgM



**QIgG:** Quociente imunoglobulina G. **QLim:** Quociente limite **QIgA:** Quociente imunoglobulina A. **QIgM:** Quociente imunoglobulina M. **Qalb:** Quociente de albumina. **BHL:** Barreira Hemato Liquórica. **Intervalo de Qalb esperado em pacientes de 5 a 60 anos:**  $5 \times 10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-3}$ .

Já para o  $Q_{alb}$ , o intervalo de referência entre o normal e o de um aumento da concentração é dependente da idade. Observando a Figura 8A, a linha tracejada vertical representa o ponto de quebra da BHL. Quando o resultado do paciente estiver à direita da linha tracejada vertical indica a quebra da BHL (REIBER, 1994).

Os diagramas representam cinco intervalos:

- (1) = normal;
- (2) = Quebra da BHL sem síntese intratecal;
- (3) = Quebra da BHL com síntese intratecal;
- (4) = Sem quebra da BHL com síntese intratecal;
- (5) = Falha metodológica (REIBER, 2003).

A caracterização das funções hiperbólicas levou em consideração a imprecisão analítica com coeficientes de variação entre 3 a 8% para os quocientes de albumina, IgG, IgA e IgM. Devido a grandes variações entre laboratórios, para a imunoglobulina intratecal a síntese deve ser considerada elevada se for maior que 10%. Os diagramas para IgG, IgA e IgM devem ser organizados acima um do outro referindo-se ao

quociente de albumina comum para facilitar o reconhecimento dos padrões de imunoglobulina relacionados à doença.

Os dados apresentados no diagrama da Figura 8C são de um paciente com paralisia do nervo facial. A fração intratecal de IgM mostrou um resultado de 40%, quando testado para anti-Borrelia (REIBER, 2001).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO

Foram incluídos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) e no Instituto Neurológico de Goiânia (ING-GO) entre 1º de março de 2022 e 31 de março de 2024 que realizaram o exame de sangue e do LCR a partir da punção lombar. Inicialmente foram selecionados 66 pacientes para o estudo, porém, 5 foram excluídos devido a resultados inconsistentes e/ou incompletos, restando 61, que foram estratificados em 2 grupos: com doenças desmielinizantes (EM, NMOSD e MOGAD) (DESM) e sem doenças desmielinizantes relacionadas (NDESM). O grupo NDESM foi composto por pacientes com sinais e sintomas elegíveis para coleta do LCR com as seguintes condições clínicas: pneumonia, hidrocefalia, acidente vascular cerebral (AVC), confusão mental, enxaqueca, cefaleia, hipertensão crânica, leucemia linfóide aguda (LLA), dengue hemorrágica, rabdomiólise, sarcopenia, síndrome gripal, recém-nascido (RN) com febre a esclarecer e sepse. O fluxograma do estudo, por grupo de pacientes e os tipos de exames, estão no esquema a seguir (Figura 09).

**Figura 9** - Desenho do estudo e estratificação dos pacientes



Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

A idade e sexo dos indivíduos foram retiradas do sistema de gestão hospitalar de ambas as instituições, assim como os dados clínicos e laboratoriais que foram obtidos do prontuário eletrônico. Os dados clínicos incluíram sexo, idade e hipótese diagnóstica. Os dados laboratoriais incluíram a avaliação do LCR como: dosagem de albumina (soro/LCR), dosagem de IgG (soro/LCR) e a pesquisa de bandas oligoclonais, a pesquisa de anti-AQP4 IgG e o anti-MOG IgG. A partir dos resultados, foram construídos os normogramas de Reiber para IgG e foram realizadas as dosagens da atividade de marcação de anticorpos para EBV, classe IgG, contra o capsídeo viral (VCA) no soro e LCR, e posteriormente foi calculado o IAE, soro/LCR, frente ao IgG total/albumina.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (CAAE 59501622.4.0000.5346).

## 3.2 METODOLOGIA DAS ANÁLISES

### 3.2.1 Amostras

As amostras de LCR e soro utilizadas nesse estudo eram de descarte de análises realizadas na rotina diagnóstica de pacientes atendidos no LING-GO e ULAC HUSM-RS. Após as análises de rotina as amostras foram armazenadas -80° C até o momento das análises complementares.

### 3.2.2 Determinação da albumina

A determinação da albumina foi realizada no LCR e no soro através do analisador bioquímico automatizado *Cobas Integra 400+*, utilizando kits comerciais da *Roche Diagnostics*<sup>™</sup>.

### 3.2.3 Determinação de proteína total

A determinação da dosagem da proteína total (proteínorraquia) foi realizada no LCR através do analisador bioquímico automatizado *Cobas Integra 400+*, utilizando kits comerciais da *Roche Diagnostics*<sup>™</sup>.



### **3.2.4 Determinação da glicose**

A determinação da glicose no sangue (glicemia) e da glicose no LCR (glicorraquia) foi realizada através do analisador bioquímico automatizado *Cobas Integra 400+*, utilizando kits comerciais da *Roche Diagnostics*<sup>TM</sup>. Já a relação da glicorraquia pela glicemia foi realizada por cálculo de razão simples preservando as unidades de medida.

### **3.2.5 Avaliação da contagem global**

A determinação da contagem global de células no LCR foi realizada utilizando a câmara de *Fuchs Rosenthal (Cole-Parmer)*<sup>TM</sup>. A partir da contagem total nos 256 quadrantes para liberação dos resultados por mm<sup>3</sup> foi calculada, por razão de divisão simples, usando o fator de 3,2 (preservando as unidades de medida), para correção do volume aplicado.

### **3.2.6 Avaliação da citologia diferencial**

A preparação da lâmina de LCR foi a partir da concentração do volume líquórico em centrífuga usando rotação de 700 a 900 rotações por minuto (rpm) durante 10 a 15 minutos. Após isso o sedimento do centrifugado foi aplicado em citocentrífuga na proporção 50/50, com albumina bovina 22% BSA<sup>TM</sup> (*Fresenius*) a 700 a 900 rpm durante 10 a 15 minutos. Na sequência a lâmina do material fixado foi corada com May-Grünwald e Giemsa da *Merck*<sup>TM</sup> (Alemanha). A citologia diferencial foi realizada em microscópio óptico observando os padrões celulares presentes até 100 células, e liberada em porcentagem relativa, por população identificada, usando critérios morfológicos.

### **3.2.7 Determinação da imunoglobulina G**

A determinação da imunoglobulina G (IgG) foi realizada do LCR e o soro através do analisador bioquímico automatizado *Cobas Integra 400+*, utilizando kits comerciais da *Roche Diagnostics*<sup>TM</sup>.

### **3.2.8 Determinação das bandas oligoclonais (BOC)**

A determinação das BOC foi realizada a partir da detecção qualitativa com a caracterização imunológica de bandas de IgG presentes no LCR e no soro. Após a

preparação das amostras foi aplicado no instrumento semiautomatizado permitindo a migração, imunofixação e detecção direta em géis de agarose para a obtenção de perfis de IgG usando o kit comercial *HYDRAGEL CSF ISOFOCUSING* usado no aparelho *HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING* da *Sebia*™.

### **3.2.9 Determinação de EBV VCA IgG**

A determinação de anticorpos IgG anti-EBV VCA foi realizada do LCR e o soro através da técnica de enzimaímmunoensaio (ELISA) utilizando kits comerciais da *Virion Serion*™ (*Institut Virion\Serion GmbH, Wurzburg*), e a leitura das absorbâncias em microplacas foram realizadas no aparelho *Bio Ez Read 2000*, marca *Biochrom*™.

### **3.2.10 Determinação do reibergrama IgG**

Para determinação dos resultados do normograma de Reiber IgG foram utilizados os programas *SERION easyANALYZE* e *SERION easyCSF* da *Virion Serion*™ (*Institut Virion\Serion GmbH, Wurzburg*).

### **3.2.11 Determinação da Anti-AQ4**

A determinação da dosagem da anti-AQ4 foi realizada no soro através da técnica Imunofluorescência indireta (IFI) utilizando kits comerciais da *Euroimmun*™ (*EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck*).

### **3.2.12 Determinação da Anti-MOG**

A determinação da dosagem do anti-MOG foi realizada no soro através da técnica Imunofluorescência indireta (IFI) utilizando kits comerciais da *Euroimmun*™ (*EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika, Lübeck*).

### **3.2.13 Determinação do IAE EBV VCA IgG**

Para determinação do IAE foram utilizados os programas *SERION easyANALYZE* e *SERION easyCSF* da *Virion Serion*™ (*Institut Virion\Serion GmbH, Wurzburg*).

### **3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As variáveis categóricas foram expressas como número de indivíduos e porcentagens e foram comparadas pelo teste do qui-quadrado. As variáveis contínuas foram expressas como mediana e intervalos interquartis, e a comparação entre os grupos foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney. Foi utilizado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

Dos 61 pacientes selecionados, 34 eram DESM, sendo 22 pacientes para EM, 11 pacientes para NMOSD e 2 pacientes para MOGAD, com idades variando entre 18 e 77 anos. Os outros 27 pacientes eram NDESM, e suas idades variaram de 28 dias até 84 anos. Além disso, o grupo dos pacientes DESM apresentou um predomínio do sexo feminino (67,6%), com uma relação de 1,6:1 (sexo feminino/sexo masculino). De modo similar, no grupo dos pacientes NDESM, houve um predomínio do sexo feminino (55,6%) com uma relação de 1,25:1. Na avaliação de rotina dos pacientes, quando foram determinadas as concentrações de glicorraquia, proteínorraquia, contagem global de células e a relação da glicorraquia/glicemia foram observados parâmetros dentro da normalidade, tanto nos pacientes DESM e NDESM. Para os pacientes NDESM não foi possível avaliar a relação glicorraquia/glicemia. A citologia diferencial revelou a presença de plasmócitos em 4 pacientes (11,7%) do grupo DESM. A distribuição detalhada de idade, sexo, proteínorraquia, relação da glicorraquia/glicemia e outros parâmetros estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Dados gerais dos pacientes DESM e NDESM

	DESM n=34	NDESM n=27	p
Idade (anos)	44 (32-55)	20 (6-45)	<b>0,006</b>
Sexo (feminino)	23 (67,6)	15 (55,6)	<b>0,333</b>
Proteínorraquia (mg/dL)	37,5 (25,7-54,0)	32 (24,0-55,0)	<b>0,441</b>
Glicemia	105,5 (90,7-143,5)	117,0 (98,5-165,0)*	<b>0,354</b>
Glicorraquia	70,5 (58,7-92,2)	63,0 (53,0-77,0)	<b>0,108</b>
Relação (GL/GS)	0,62 (0,55-0,72)	0,60 (0,51-0,68)*	<b>0,548</b>
Contagem global (mm <sup>3</sup> )	3,0 (2,0-4,0)	1,0 (1,0-3,0)	<b>0,004</b>
Plasmócitos	4 (11,7)	0	

GL: Glicorraquia. GS: Glicemia. DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. NDESM: Pacientes do grupo de doenças não desmielinizantes. As variáveis de sexo e plasmócitos estão apresentados como número de indivíduos (porcentagem) e os grupos foram comparados pelo teste Qui-Quadrado de Pearson. As variáveis contínuas estão apresentadas como mediana (intervalo interquartil) e foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. \* n=12.

As dosagens de albumina, assim como as dosagens de imunoglobulina IgG total no soro e no LCR foram realizadas em 31 (91,2%) pacientes do grupo DESM, e não foram realizadas no grupo de pacientes NDESM. Já as BOC, por IEF, no soro e LCR, foram realizadas em 33 (97,1%) no grupo de pacientes DESM, assim como a

avaliação do normograma de Reiber (reibergrama) IgG total, no soro e no LCR, em 31 (91,2%), e não foram realizadas no grupo de pacientes NDESM. As dosagens da atividade de marcação (unidades) de anticorpos EBV VCA IgG, no soro e no LCR, foram realizadas em todos os pacientes do estudo e foi possível calcular o IAE EBV VCA IgG em 31 (91,2%) do grupo de pacientes DESM, enquanto não foi realizado no grupo de pacientes NDESM. O exame de anti-AQP4 IgG, foi realizado em 6 pacientes (60%) com NMOSD e o anti-MOG IgG foi realizado em 100% dos pacientes com MOGAD, do grupo de pacientes DESM.

O resultado da atividade de marcação (unidades) EBV VCA IgG para o grupo de pacientes DESM teve mediana de título de 44,3 no soro e 31,5 no LCR, enquanto no grupo de pacientes NDESM foi de 24,8 no soro e 10,3 no LCR (valor de referência EBV VCA IgG quando reagente:  $\geq 15,0$  unidades). Esses resultados demonstraram que 94,1% dos pacientes DESM foram reagentes para EBV VCA IgG no soro e 73,5% no LCR, e já para pacientes NDESM, 63,0% foram reagentes no soro e 44,4% no LCR. Em relação as unidades EBV VCA IgG, houve maior atividade de marcação em pacientes DESM comparados aos pacientes NDESM, tanto para soro como no LCR, conforme demonstrada na Tabela 3.

**Tabela 3:** Medianas de unidades e frequência de pacientes reagentes para EBV VCA IgG

	DESM n=34	NDESM n=27	p
Unidades Soro	44,3 (32,8-49,9)	24,8 (3,9-40,9)	<b>0,009</b>
Reagente Soro	32 (94,1)	17 (63,0)	<b>0,003</b>
Unidades LCR	31,5 (12,1-46,1)	10,3 (3,7-36,6)	<b>0,023</b>
Reagente LCR	25 (73,5)	12 (44,4)	<b>0,021</b>

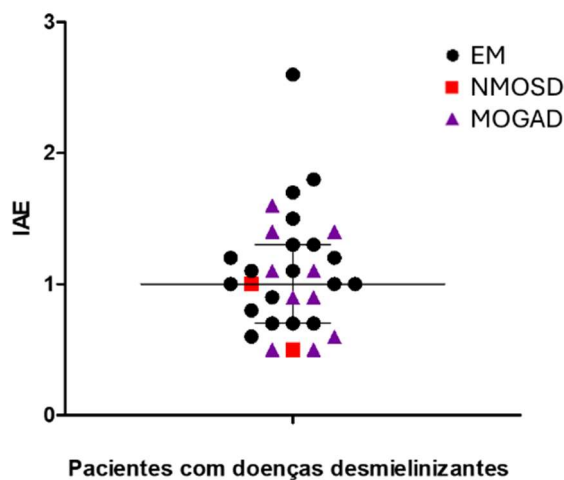
DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. NDESM: Pacientes do grupo de doenças não desmielinizantes. Os dados categóricos estão apresentados como número de pacientes (porcentagem) e foram comparados pelo teste Qui-Quadrado de Pearson. As variáveis numéricas estão apresentadas como mediana (intervalo interquartil) e foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney.

Quando os pacientes NDESM foram estratificados por faixa etária: 28 dias (RN), de 1 a 18 anos, e maiores de 18 anos, as dosagens da atividade de marcação de anticorpos (unidades) EBV VCA IgG tiveram uma mediana no soro de 37,7 (36,1-39,2), de 3,9 (1,7-32,1) e de 41,0 (30,4-50,1), respectivamente. Já no LCR, esses mesmos pacientes tiveram uma mediana de 62,4 (52,7-84,1), de 3,7 (1,6-11,0) e de 29,8 (11,9-44,8). Pacientes menores de 18 anos, exceto RNs, foram 100% não

reagentes para a atividade de marcação de anticorpos EBV VCA IgG, com títulos <15,0 unidades (soro e LCR). Por outro lado, o grupo de pacientes NDESM RN apresentou a maior média da atividade de marcação de anticorpos (unidades) EBV VCA IgG no LCR, com título de 68,4, quando comparados a todos os pacientes do estudo (DESM e NDESM).

Já o IAE para EBV VCA IgG foi realizado apenas no grupo de pacientes DESM e apresentou uma mediana de 1,08 (0,51-2,56), conforme Figura 10. Três pacientes foram excluídos porque não tinham dados de albumina no soro e no LCR, necessários para a construção do IAE. A estratificação dos pacientes DESM de acordo com o índice de IAE estão demonstrados na Tabela 4. Apenas um paciente (3,2%) DESM apresentou IAE acima de 2,5.

**Figura 10** - Índice de anticorpos específicos (IAE) para EBV VCA IgG



EM: Esclerose Múltipla. NMOSD: Distúrbio do Espectro da Neuromielite Óptica. MOGAD: Distúrbio Associado à Glicoproteína da Mielina do Oligodentrócito.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2024.

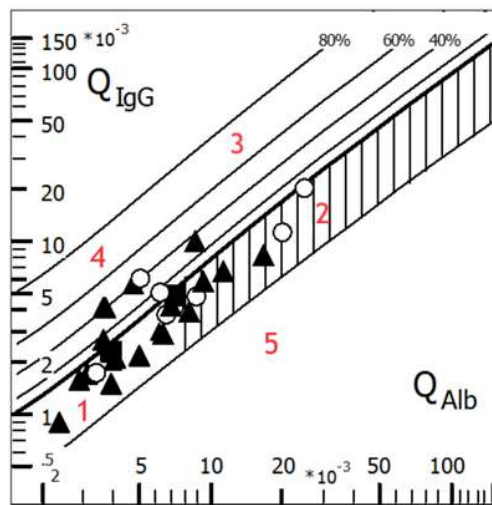
**Tabela 4** - Índice de anticorpos específicos (IAE) EBV VCA IgG de pacientes do grupo de doenças desmielinizantes (DESM)

Interpretação	Intervalo*	Pacientes (n=31)**
Sem significado clínico (IAE ≤ 0,6)	0,5 (0,5-0,6)	5 (16,1)
Normalidade (IAE 0,7 a 1,4)	1,0 (0,9-1,2)	21 (67,8)
Clinicamente relevante (IAE ≥ 1,5)	1,6 (1,5-1,8)	4 (12,9)
Definitivamente patológico (IAE ≥ 2,5)	2,6	1 (3,2)

\*Mediana (intervalo interquartil) \*\*Número de indivíduos (porcentagem).

Os padrões do reibergrama, no grupo de pacientes DESM, conforme o comportamento por perfil, revelaram um predomínio da região 1 (46,7%), seguido pela região 4 (36,7%), região 3 (10,0%) e região 2 com (6,7%), conforme Figura 11. Já os comportamentos no reibergrama de cada uma das doenças no grupo de pacientes DESM estudadas também estão apresentados na Figura 11. Em adição, o comportamento do reibergrama exclusivo para pacientes com EM está demonstrado na figura 12.

**Figura 11-** Distribuição por região no reibergrama IgG dos pacientes DESM



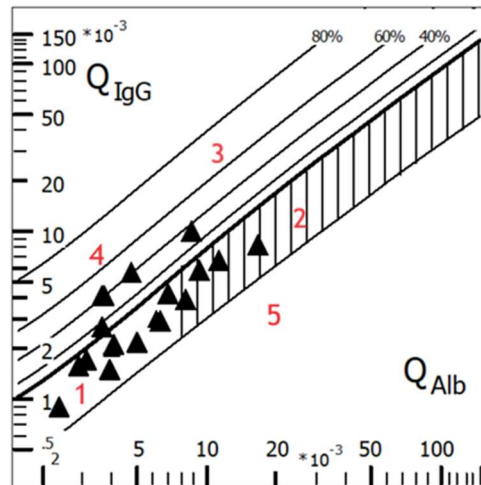
**Região 1:** Sem síntese intratecal e sem quebra de barreira. **Região 2:** Sem síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 3:** Com síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 4:** Com síntese intratecal sem quebra de barreira. **Região 5:** Erro analítico.

DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. NDESM: Pacientes do grupo de doenças não desmielinizantes. ▲: Pacientes EM | ○: Pacientes NMOSD | ■: Pacientes MOGAD **Q<sub>IgG</sub>**: Quociente imunoglobulina G. **Q<sub>Alb</sub>**: Quociente de albumina.

Fonte: Normograma de Reiber IgG construído pelo autor.

A presença de BOC no grupo DESM foi detectada em 10 pacientes (30,3%), sendo 7 pacientes na EM (33,3%), 2 pacientes na NMOSD (20,0%) e 1 paciente na MOGAD (50,0%). Já o tipo predominante de perfil da corrida de IEF, no geral foi do tipo 2, com 50%, dos pacientes DESM. Na EM foi observado o seguinte perfil: tipo 2 (57,1%), tipo 3 (28,6%), tipo 4 (14,3%). Na NMOSD um paciente foi classificado como tipo 3 (50,0%) e o outro como tipo 4 (50,0%). O paciente MOGAD foi classificado como tipo 2. A distribuição por região no reibergrama dos pacientes DESM com bandas oligoclonais presentes, está apresentada na Figura 13.

**Figura 12** - Distribuição por região no reibergrama IgG dos pacientes DESM com EM

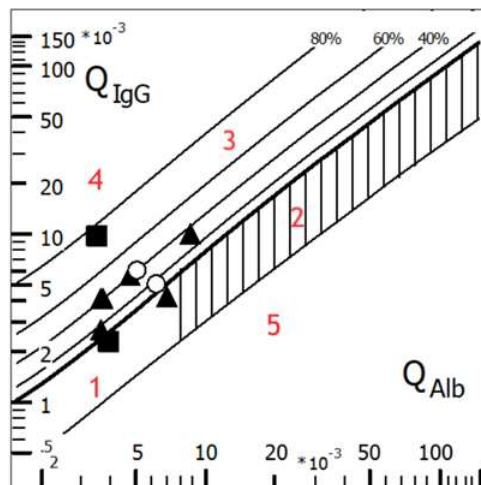


**Região 1:** Sem síntese intratecal e sem quebra de barreira. **Região 2:** Sem síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 3:** Com síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 4:** Com síntese intratecal sem quebra de barreira. **Região 5:** Erro analítico.

DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. NDESM: Pacientes do grupo de doenças não desmielinizantes. **Legenda:** ▲: Pacientes EM. **Q<sub>IgG</sub>:** Quociente imunoglobulina G. **Q<sub>Alb</sub>:** Quociente de albumina.

Fonte: Normograma de Reiber IgG construído pelo autor.

**Figura 13** - Distribuição por região no reibergrama dos pacientes DESM com bandas oligoclonais presentes



**Região 1:** Sem síntese intratecal e sem quebra de barreira. **Região 2:** Sem síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 3:** Com síntese intratecal e com quebra de barreira. **Região 4:** Com síntese intratecal sem quebra de barreira. **Região 5:** Erro analítico.

DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. NDESM: Pacientes do grupo de doenças não desmielinizantes. ▲: Pacientes EM | ○: Pacientes NMOSD | ■: Pacientes MOGAD. **Q<sub>IgG</sub>:** Quociente imunoglobulina G. **Q<sub>Alb</sub>:** Quociente de albumina.

Fonte: Normograma de Reiber IgG construído pelo autor.



Foram observados nos pacientes DESM com a presença de BOC, quando associado ao perfil do reibergrama na região 4, uma concomitância de 88,9%, E No comparativo dos pacientes DESM com a presença de BOC, associado ao perfil do reibergrama na região 4 observamos a mediana de 1,1 para IAE do EBV VCA IgG, conforme demonstrado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Perfil do reibergrama dos pacientes DESM (n=29) que realizaram a determinação das BOC e o IAE VCA IgG

Reibergrama	BOC	IAE	BOC	IAE
	Presente*	EBV VCA IgG**	Ausente*	EBV VCA IgG**
Região 1	1 (11,1%)	0,90	13 (65,0%)	1,1 (1,0-1,3)
Região 2	0,0%	NA	1 (5,0%)	0,60
Região 3	0,0%	NA	3 (15,0%)	0,70 (0,5-0,9)
Região 4	8 (88,9%)	1,1 (0,7-1,5)	3 (15,0%)	1,0 (0,6-1,6)

\* Número de indivíduos (porcentagem). \*\* Mediana (intervalo interquartil). DESM: Pacientes do grupo doenças desmielinizantes. BOC: bandas oligoclonais.

Todos os pacientes DESM (n=34), na suspeita de NMOSD e MOGAD, realizaram a determinação sérica IgG anti-AQP4 e anti-MOG, e apresentaram resultados não reagentes.

## 5 DISCUSSÃO

Foi observado uma idade mediana maior (44 anos) para pacientes DESM em comparação aos pacientes do grupo NDESM (28 anos). O predomínio foi do sexo feminino, em ambos os grupos, com proporção um pouco maior (1,6:1) no grupo DESM em comparação com NDESM (1,25:1). Na literatura essa proporção média de pacientes com doenças desmielinizantes é de 2:1 (feminino/masculino) (WHO, 2008), o que apresenta uma amostragem similar. Já para o início dos sinais e sintomas espera-se que surjam a partir dos 20 a 30 anos de idade, conforme Revital e colaboradores destacaram em 2022. Assim, podemos perceber que a proporcionalidade por sexo e do perfil dos pacientes DESM por faixa etária, tem uma similaridade com a literatura já publicada.

As análises básicas de rotina como glicorraquia, proteínorraquia, contagem global e diferencial não mostraram relevância no apoio diagnóstico direto, entretanto vale ressaltar que, mesmo assim é de extrema importância para o diagnóstico

diferencial com infecções que mimetizam os sinais e sintomas. A maioria dos pacientes DESM com presença de BOC não tinham a presença de plasmócitos no citológico diferencial e quando presentes não estiveram diretamente relacionados com a detecção das BOC e no reibergrama.

Em 2023, Bjornevik e colaboradores, demonstraram uma associação 32 vezes maior em pacientes que tiveram a reativação do EBV com desenvolvimento da EM, frente a pacientes que não tiveram a reativação observados desde antes do aparecimento da desmielinização. Com isso surgiu a necessidade de abordagens diagnósticas com uma visão mais ampla. Atualmente, quando pensamos em apoio diagnóstico os ensaios sorológicos são os preferidos pela classe médica, pois são de mais fácil acesso à população e de menor custo. Para os laboratórios, a disponibilidade comercial dos kits para EBV, para sorodiagnóstico, se apresentam em 3 classes: os que buscam os antígenos do capsídeo viral (VCAs), os antígenos iniciais (EAs) e os antígenos nucleares (EBNAs, 1 e 2). Nesse estudo utilizamos o EBV VCA IgG por ELISA, tanto no soro quanto no LCR.

Já quanto ao EBV, vale lembrar que tem uma incidência de distribuição universal e é considerada uma infecção comum, estando presente em torno de 90% a 95% da população adulta (AL-OBAIDI *et al.*, 2022; HESS, 2004). Quando comparamos ao nosso estudo, esses números pareados mostraram também uma similaridade nos testes EBV VCA IgG no soro, pois 94,1% dos pacientes DESM, e 63,0% dos pacientes NDESM, foram reagentes. A menor incidência de EBV reagente, tanto no soro como no LCR, em pacientes NDESM pode ser justificada em parte pela mediana de 28 anos, já que em nosso estudo pudemos perceber que os pacientes entre 1 e 18 anos foram 100% não reagentes para a atividade de marcação de anticorpos EBV VCA IgG, com títulos <15,0 unidades, tanto no soro como no LCR. Por outro lado, os pacientes NDESM RN apresentaram a maior mediana de EBV VCA IgG no LCR, com título de 68,4, quando comparados a todos os pacientes do estudo e essa presença de altos títulos de anticorpos é devido a transmissão materno-fetal (ABRAHAMYAN, 2020; SHARIPOUR, 2020).

Podemos observar que as concentrações máximas de anticorpos tendem a coincidir com o início dos sintomas. Aproximadamente duas semanas após a infecção inicial, o EBV VCA IgG é detectado, e atinge um pico cerca de seis semanas após o surgimento dos sintomas. O nível de EBV VCA IgG permanece elevado durante toda

a vida e também pode haver a reativação do vírus, na imunossupressão (AALTO, 1998; BAUER, 2001; DOBSON *et al.*, 2013; HESS, 2004).

A forte relação que a EM tenha associação com uma causa infecciosa tem sido sugerida por pesquisas recentes (BJORNEVIK *et al.*, 2023), principalmente envolvendo EBV, que recorrentemente é citado como potencial implicador do risco, da exacerbação e da progressão da EM (AL-TEMAIMI *et al.*, 2022). Nessa linha, tem sido sinalizado que anticorpos formados em uma reativação por EBV, tem um envolvimento da região do EBNA1. Esta região, que liga aos anticorpos, mimetiza molecularmente a mesma região de ligação da GlialCAM, que está expressa em astrócitos e oligodendrócitos (células da glia). Esse efeito em cadeia, seria o fator desencadeante da desmielinização no SNC (LANZ, 2022; ATTFIELD, *et al.*, 2022).

Em nosso estudo buscamos entender e relacionar, se as concentrações de EBV VCA IgG também teriam uma atividade associada à reativação para os pacientes DESM. Vale lembrar que a pesquisa de anticorpos para EBV no soro e LCR é utilizada em investigações de infecções como meningites e encefalites. Nestes casos, a quantificação simples de unidades EBV VCA IgG, na presença de sinais e sintomas tende a ser útil.

Entretanto, na EM, o processo de desmielinização ocorre no SNC, e esse distúrbio, exige uma avaliação do LCR de maneira diferente. O SNC é um sistema que tem comportamentos e regulações diferenciadas do resto do corpo, principalmente pela presença da BHE, que é o limite anatômico, bioquímico, e imunológico entre a corrente sanguínea e o parênquima cerebral. A BHE, portanto, age como um regulador restritor da entrada e saída de substâncias, metabólitos e anticorpos entre o sangue e LCR. Essa dinâmica está atrelada as funções da teoria da difusão molecular ↔ fluxo do LCR, contemplando a velocidade, a idade do paciente e a área de troca sangue/LCR, ao longo do espaço subaracnóideo, a partir do peso molecular e do raio hidrodinâmico das moléculas (REIBER, 1994).

Assim, justamente por haver a BHE, as concentrações dos anticorpos não podem ser interpretadas de forma linear através de quantificação simples de unidades para EBV VCA IgG. Quando investigamos a presença de anticorpos EBV VCA IgG de forma linear, ou seja, de forma isolada, no soro e no LCR, tivemos resultados reagentes nos pacientes DESM em 94,1% e 73,5%, respectivamente. Embora apresentando incidência menor de pacientes reagentes, o grupo NDESM também teve um comportamento similar. Dessa forma, a determinação do EBV VCA IgG no

soro e LCR não é suficiente para diferenciar pacientes DESM de NDESM. Além disso, não há como saber se o anticorpo detectado está sendo produzido no sangue e/ou no SNC. Portanto, para compreender essa relação é necessário a aplicação do reibergrama e do IAE.

Quando avaliamos o IAE nos pacientes do nosso estudo foi observado uma mediana de EBV VCA IgG inferior ao ponto de corte para produção intratecal deste anticorpo nos pacientes DESM. Esse valor é bem inferior para considerarmos uma atividade de anticorpos no padrão definitivamente patológico ( $> 2,5$ ). Portanto, uma sorologia reagente usando uma interpretação linear para o SNC, pode não representar uma atividade real quando aplicado o IAE. A busca dessa atividade no estudo visou estabelecer uma relação do EBV como gatilho da reativação (BJORNEVIK *et al.*, 2023) nos pacientes DESM. Os resultados deste estudo a partir do VCA, não demonstraram a relação justificada da síntese intratecal, e a relação da atividade direta como fator gerador da desmielinização. Por outro lado, isso pode sinalizar a real possibilidade de que realmente o antígeno do EBNA1 possa ser o ponto chave do rearranjo cruzado com a GlialCAM para desmielinização (LANZ, 2022; ATTFIELD, *et al.*, 2022).

A desmielinização está associada a presença de clones expandidos de linfócitos B que são produzidos localmente no SNC, sendo os responsáveis pela síntese intratecal e pela formação de BOC que são observadas em mais de 90% dos pacientes com EM em estudos europeus e americanos (FRAUSSEN, 2009). Entretanto, no nosso estudo a presença de BOC na EM, foi de 33,3%, bem inferior aos dados da literatura internacional. Contudo, nossos dados são similares a literatura nacional, publicada em 2024 que demonstrou 44,4% de presença de BOC em um grupo de pacientes estudados (DOMINGUES, *et al.*, 2024). Esta diferença entre os dados da literatura nacional e internacional pode estar relacionada a miscigenação da população brasileira.

Quando associamos a presença de BOC, com o resultado do reibergrama na região 4, ou seja, com síntese intratecal e sem a quebra da BHE, tivemos uma concordância de 88,9% nos resultados dos pacientes com DESM. Já a mediana de IAE EBV VCA IgG dos pacientes DESM com presença de BOC e reibergrama na Região 4 foi de 1,1. Dessa forma, comprovamos que os pacientes que apresentam síntese intratecal, que possivelmente estão gerando a desmielinizações, não está relacionadas ao IAE EBV VCA IgG, pois o nosso resultado foi inferior a 2,5. Esses

mesmos pacientes DESM, na testagem da sorologia linear EBV VCA IgG apresentaram títulos reagentes em 100% dos pacientes no soro e em 70% dos pacientes no LCR.

Já os resultados para os pacientes DESM que realizaram a determinação sérica de anti-AQP4 IgG com NMOSD e anti-MOG IgG, apresentaram resultados não reagentes em todos os testes e pacientes, indicando que a técnica de escolha pode ser um ponto de atenção para a busca assertiva desses marcadores.

As limitações do nosso estudo incluem a falta de acompanhamento para construir uma comparação na evolução clínica dos pacientes em uma linha do tempo. Além disso, as limitações adicionais envolvem a impossibilidade de comparação de marcadores, como reibergrama, BOC, e IAE dos pacientes DESM com os pacientes NDESM. Apesar disso, nosso estudo mostrou que os pacientes DESM tem uma proporcionalidade por sexo e predomínio, e a incidência da presença de BOC semelhante a literatura nacional, assim como a maior incidência da atividade de anticorpos EBV VCA IgG nos pacientes DESM comparados aos pacientes NDESM. A correlação da presença de BOC com o reibergrama na região 4 teve uma concordância em 88,9% dos pacientes DESM, entretanto mesmo com a presença da síntese intratecal, os nossos resultados não sinalizaram a relação com o antígeno EBV VCA IgG.

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ Os pacientes DESM apresentaram um perfil clínico semelhante aos observados em literatura já consolidada, ou seja, a maioria foram mulheres na proporção de 1,6:1. Nos parâmetros básicos como na relação da glicorraquia/glicemia, na dosagem de proteínorraquia e na celularidade mantiveram os resultados de mediana dentro dos valores de referência para amostras coletadas por punção lombar.
- ✓ Os pacientes DESM apresentaram maior incidência da presença da atividade de anticorpos para EBV VCA IgG frente aos pacientes NDESM, tanto no soro quanto no LCR. Entretanto, mesmo com a presença da atividade de anticorpos EBV VCA IgG reagente, o antígeno VCA parece não ser o anticorpo sinalizador da reação cruzada de mimetização relacionada ao EBV, já que os resultados de IAE não refletiram essa associação.

- ✓ Pacientes entre 1 e 18 anos foram 100% não reagentes para a atividade de marcação de anticorpos EBV VCA IgG.
- ✓ A presença de BOC em 33,3% dos pacientes DESM com EM é similar a literatura brasileira, mas discordante na literatura mundial.
- ✓ Os dois pacientes NDESM RN apresentaram altos títulos de anticorpos EBV VCA IgG no LCR.
- ✓ A presença de síntese intratecal avaliada pelo reibergrama na região 4 foi concordante em 88,9% dos pacientes com a presença de BOC por IEF;
- ✓ O IAE EBV VCA IgG foi inferior a 2,5 em 96,9% nos pacientes DESM, mesmo na presença de BOC e com o reibergrama apresentando resultado na região 4 (presença de síntese intratecal).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTO, S., M. Immunoreactivation of Epstein-Barr Virus Due to Cytomegalovirus Primary Infection. **Journal Medicine Virology** 56, 186 – 91, 1998.
- ABRAHAMYAN, S., EBERSPACHER, B., HOSHI, M., M., *et al.* Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. **J Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**; 91:681–686.2020.
- ABSINTA, M., MARIC, D., GHARAGOZLOO, M., GARTON, T., SMITH, M. D., JIN, J., FITZGERALD, K. C., SONG, A., LIU, P., LIN J, P., WU, T., JOHNSON, K., MCGARVERN, D, B., SCHAFFER, D, B., CALABRESI, P, A., REICH, D, S. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. **Nature**. September ; 597(7878): 709–714, 2021.
- AL-TEMAIMI, R., ALROUGHNANI, R., JACOB, S., , AL-MILLA, F. Gender influence in EBV antibody response in multiple sclerosis patients from Kuwait, **Journal of Neuroimmunology**, vol. 285, pp. 57–61, 2015.
- AL-OBAIDI, B., ZAINAB, A., ALMASHTA, S.A.R, GHAZI, H.F., The potencial role of Epstein-Barr vírus in multiple sclerosis molecular and serological study. **Wiadomości Lekarskie**, Volume LXXV, Issue 3, March 2022.
- ALANIZI, A., Epstein–Barr Virus (EBV) and Multiple Sclerosis Disease: A Biomedical Diagnosis, **Computational Intelligence and Neuroscience**, Volume 2022.
- ANNIBALI *et al.* IFN- $\beta$  and multiple sclerosis: From etiology to therapy and back. Cytokine Growth. **Factor Reviews**. 26, 221–228, 2015.
- ATTFIELD, K., E. JENSEN, L., J., KAUFMANN, M., FRIESE, M., A., FUGGER, L. The immunology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**. Dec; 22(12):734-750, 2022.
- BCTRIMS. Comitê Brasileiro de Tratamento e Pesquisa em Esclerose Múltipla. – **Esclerose Múltipla**, 2023.
- BARRALLO-GIMENO, A., ESTÉVEZ, R. GlialCAM, a glial cell adhesion molecule implicated in neurological disease. **Advances in Neurobiology**, 8:47-59, 2014.
- BARRIOS-LAMOTH, E., DORTA-CONTRERESA, A. J. Antibody Index in neuroimmunoepidemiological studies. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**; 38(1):e143, 2019.
- BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Portaria no 391, de 5 de maio de 2015. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. CONITEC. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. Brasília: **Diário Oficial da União**, 2021.
- BJORNEVIK, K.; MUNZ, C.; CHOEN, J.I.; ASCHERIO, A.; Epstein–Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications. **Nature Reviews Neurology**, Volume 19, p.160–171, 2023.

BROZA, C.M., HUTT-FLETCHER, L.M. Alternate replication in B-cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. **Nature Medicine**. 8:559– 560, 2002.

BAUER, G. Simplicity Through Complexity: Immunoblot With Recombinant Antigens as the New Gold Standard in Epstein-Barr Virus Serology. **Clinical Laboratory**. 47, 223 – 30, 2001.

BORGERS, L. HENGELBURG, H. J., JANSSEN, M., UNGER P. P. A., MELIEF, M. J., WIERENGA-WOLF, A. F., HSIAO, C. C., MASON, M. R., HAMANN, J., VAN LANGELAR, J., SMOLDERS, J., VAN LUIJN, M. M. Selective emergence of antibody-secreting cells in the multiple sclerosis brain. **The Lancet**, Vol 89 March, 2023.

BULAT, M.; KLARICA, M.; Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid, **Brain Research Reviews**., n.112, p.65–99, 2011.

COBO-CALVO, A., RUIZ, A., MAILLART, E., AUDOIN, B., ZEPHIR, H., BOURRE, B. Clinical spectrum and prognostic value of CNS MOG autoimmunity in adults: the MOGADOR study. **Neurology**, 90: e1858-69, 2018.

COHEN, J. Epstein-Barr Virus Infection. **New England Journal Medicine**. 343:481-92, 2000.

CORBALI, O., CHITNIS, T. Pathophysiology of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody disease. **Frontiers Immunology**; 14:1137998. 2023.

COSTA-NETO, J. B.; Manual Prático Teórico de Líquor com Atlas, 3 ed., Campo Grande, **Editora Life**, 2015.

COSTA NETO, J. B; *et al*; Leucemia Linfóide Aguda: a importância do laboratório de líquido para o sucesso do tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.41, n.3, p.201-203, 2009.

DEISENHAMMER, F., ZETTERBERG, H., FITZNER, B., ZETTL U. K. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. **Frontiers Immunology**. 10:726, 2019.

DE GROOT-MIJNES, J. D., ROTHVA, A., VAL LOON, A. M., SCHULLER, M., TEM DAM-VAN LOON, N. H., DE BOER, J. H., *et al*. Polymerase chain reaction and Goldmann-Witmer coefficient analysis are complimentary for the diagnosis of infectious uveitis. **American Journal of Ophthalmology**; 141:313e8, 2006.

DOBSON, R., TOPPING, J., GIOVANNONI, G. Comparison of two commercial ELISA systems for evaluating anti-EBNA1 IgG titers. **Journal Medicine Virology**. 85, 128 – 31, 2013.

DOS PASSO, G. R., BECKER, J., VARELA, D. L., FRÖHLICH, A. C., RECH, B. C., MATOS, A. C. S., CALLEGARO, D., LANA-PEIXOTO, M. A., Prevalence of multiple sclerosis in key cities of Brazil: a study in Passo Fundo, Southern Brazil. **Arquivos Neuropsiquiatria**; 79(8):692-696, 2021.

DOMINGUES, R. B., SANTOS, M., V., SALOMÃO, D., SENNE, C. Concordance rate between oligoclonal bands and the Kappa index in patients with suspected multiple sclerosis (MS). **Arquivos Neuropsiquiatria** Vol. 82 No. 3/2024.



DUSSAIX, E., CERQUETI, P. M., PONT, F., BLOCH-MICHEL, E. New approaches to the detection of locally produced antiviral antibodies in the aqueous of patients with endogenous uveitis. **Ophthalmologica**; 194:145e9, 1987.

FRAUSSEN, J., VROLIX, K., MARTINEZ-MARTINEZ, P., LOSE, M., DE BAETS, M. H., STINISSEN, P., SOMERS, V. B cell characterization and reactivity analysis in multiple sclerosis. **Autoimmunity Reviews** 8, 654–658, 2009.

GAJOFATTO, A; BENEDETTI, M. Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? **World Journal Clinical Cases** 3, 545 2015.

GAMA, P. D., MACHADO, L. R., LIVRAMENTO, J. A., GOMES, H. R., ADONI, T., LINO, A. M. M., MARCHIORI, P. E., MORALES, R. R., LANA-PEIXOTO, M. A., CALLEGARO, D. Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo. **Arquivos Neuropsiquiatria**; 67(4):1017-1022; 2009.

GEQUELIN, L.C., RIEDIGER, I.N., NAKATANI, S.M., BIONDO, A.W., BONFIM, C.M. Epstein-Barr virus: general factors, virus-related diseases and measurement of viral load after transplant. **Revista Brasileira Hematologia Hemoterapia**, 33:383-8, 2011.

HALL, L.D., EMINGER, L.A., HESTERMAN, K.S., HEYMANN, W.R. Epstein-Barr virus: Dermatologic associations and implications Part I. Mucocutaneous manifestations of Epstein-Barr virus and nonmalignant disorders. **Journal of the American Academy of Dermatology**. 72:1-19, 2015.

HESS, R.D. Routine Epstein-Barr Virus Diagnostics from the Laboratory Perspective: Still Challenging after 35 Years. **Journal of Clinical Microbiology**, Aug, p. 3381–3387, 2004.

HOSHINO, Y., NOTO, D., SANO, S., TOMIZAWA, Y., YOKOYAMA, K, HATTORI, N. Dysregulated B cell differentiation towards antibody-secreting cells in neuromyelitis optica spectrum disorder. **Journal Neuroinflammation**, 19(1):6, 2022.

JARIUS, S., PAUL, F., WEINSHENKER, B. G., LEVY, M., KIM, H. J., WILDREMAN, B. Neuromyelitis optica. **Nature Reviews Disease Primers**, 6(1):85, 2020.

JARIUS, S., PAUL, F., FRANCIOTTA, D., RUPRECHT, K., RINGELSTEIN, M., BERGAMASCHI, R. Cerebrospinal fluid findings in aquaporin-4 antibody positive neuromyelitis optica: results from 211 lumbar punctures. **Journal Neurology Science**, 306(1–2):82–90, 2011.

JIN, H., LU, Q., GAO, F., HAO, H. Application of oligoclonal bands and other cerebrospinal fluid variables in multiple sclerosis and other neuroimmunological diseases: a narrative review. **Annals of Translational Medicine**, 11(7):282, 2023.

KYLLESBECH, C. TRIER, N., SLIBINSKAS, R., CIPLYS, E., TSAKIRI, A., FREDERIKSEN, J.L., HOUEN, G., Virus-specific antibody indices may supplement the total IgG index in diagnostics of multiple sclerosis, **Journal of Neuroimmunology**, volume 367, 2022.

- KIM, H. J., PAUL, F., LANA-PEIXOTO, M. A., TENEMBAUM, S., ASGARI, N., PALACE, J. MRI characteristics of neuromyelitis optica spectrum disorder: an international update. **Neurology**, 84: 1165-73, 2015.
- KUNKL, M., FRASCOLLA, S., AMORMINO, C., VOLPE, E., TUOSTO, L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. **Cells**, 9, 482, 2020.
- LANZ, T.V., BREWER, R.C., HO, P.P, *et al.* Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. **Nature** 603, 321–327, 2022.
- LEVIN, L., I. *et al.* Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis, **Journal American Medical Association (JAMA)**, 293, 2496–2500, 2005.
- LIVRAMENTO, J. A; *et al*; Coleta do Líquido Cefalorraquidiano, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Aspectos Éticos em Pesquisa. **Arquivos Neuropsiquiatria**, v.60, n.3A, p.33-41, 2002.
- LINDE, A. Diagnosis and pathogenesis of infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus-associated disease. **Revista Medicina Microbiologia**. 3, 43 – 51, 1992.
- LOVE, S. Demyelinating diseases. **Journal Clinical Pathology**, 59:1151–1159, 2006.
- MACSWEEN, K.F., CRAWFORD, D.H. Epstein-Barr virus—recent advances. **Lancet Infectology Disease**. 3:131–140, 2003.
- MACHADO et al. Recomendações Esclerose Múltipla. São Paulo: **Omnifarma** 2012.
- MOHAMMADI, M. Brief Note on Multiple Sclerosis. **Journal of Multiple Sclerosis**, Vol.8, Issue 1, 01-08, 2021.
- MOHSENI, M., BONIFACE, M., P., GRAHAM, C. Mononucleosis. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing** Jan; 2024.
- MÜNZ, C., MIDDEDORP, J.M. Epstein-Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology 391, **Springer International Publishing Switzerland**, 2015.
- NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE (NEJM) **Ilustred Glossary** ([www.nejm.org](http://www.nejm.org)) - 2023.
- OLIVEIRA, E. & SOUZA, N. Esclerose Múltipla. **Revista Neurociências** 6, 114–118, 1998.
- OPITC NEURITIS STUDY GROUP. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. **Archives Neurology**, 65: 727-32, 2008.
- PARODI, B., KERLERO DE ROSBO, N., The Gut-Brain Axis in Multiple Sclerosis. Is Its Dysfunction a Pathological Trigger or a Consequence of the Disease? **Frontiers Immunology**. 12:718220, 2021.

PEREIRA et al. Prevalence of multiple sclerosis in Brazil: A systematic review. **Multiple Sclerosis Related Disorders**. 4, 572–579, 2015.

PITTOCK, S. J., *et al.* Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. **Archives Neurology**, 63(7):964-8, 2006.

REIBER, H., UNGEFEHR, S., JACOBI, C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis**, vol 4, 111–117. 1998.

REIBER, H.; Proteins in cerebrospinal fluid and blood: Barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. **Restorative Neurology and Neurosciences**, v.21, n.3-4, p.79-96, 2003.

REIBER, H.; Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. **Clinica Chimica Acta**, v.310, n.2, p.176-186, 2001.

REIBER, H.; Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) - a concept common to normal blood-csf barrier function and dysfunction in neurological diseases. **Journal of Neurological Sciences**, v.122, n.2, p.189-203, 1994.

REVITAL, M., FISHBAIN, F., What's Is Multiple Sclerosis? **Journal American Medical Association (JAMA)**, November 22/29, Volume 328, Number 20, 2022.

RICKINSON, A.B., KIEFF, E. Epstein-Barr virus, p. 2575–2627. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, and B. Roizman (ed.), **Fields Virology**, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa, 2001.

RODRIGUEZ-ACEVEDO, B., ROVIRA, A., VIDAL-JORDANA, D., MONCHO, D., PARETO, D., SASTRE-GARRIGA, J. Neuritis óptica: etiopatogenia, diagnóstico, pronóstico y manejo. **Revista Neurologia**, 74:93-104, 2022.

ROSS, A.M., LEAHY, C.I., NEYLON, F., STEIGEROVA, J., FLORD, P., NAVRATILOVA, J., URBANKOVA, H., VRZALIKOVA, K., MUNDO, L., LAZZI, S., *et al.* Epstein–Barr Virus and the Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Life**, 13, 521.2023.

ROMAGNOLI, L.; MARCATI, P.; DONATELLI, D.; A comparison of two mathematical models of the cerebrospinal fluid dynamics, **Mathematical Biosciences and Engineering**, v.16, n.4, p.2811-2851, 2019.

ROSTASY, K.; REIBER, H.; POHL, D.; LANGE, P.; OHLENBUSCH, A.; EIFFERT, H.; MAASS AND F, M.; Chlamydia pneumoniae in children with MS: Frequency and quantity intratecal antibodies. **Neurology**, v.61, n.1, p.125-128, 2003.

SANGUEZA-ACOSTA, M., SANDOVAL-ROMERO, E. Epstein-Barr virus and Skin. **Jornal Brasileiro Dermatologia**, 93(6):786-99, 2018.

SHAMIER, M.C., *et al.* The role of antibody indexes in clinical virology **Clinical Microbiology and Infection**, 27-1207 e 1211, 2021.

SILVA, R. S., DOMINGUETI, C. P., TINOCO, M. S., VELOSO, J. C., PEREIRA, M. L., BALDONI, A. O., RIOS, D. R. A. Interference of medicines in laboratory exams. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial**, 57: 1-15, 2021.

SHOLER, M. P., LAVRADO, F. P., BASTOS, R. R. G., BRANDÃO, C. O., PAPAIZ-ALVARENGA, R. Esclerose Múltipla: Correlação clínico-laboratorial. **Arquivos Neuropsiquiatria**;59(1):89-91, 2001.

SIMPSON, S., Jr., WANG, W., OTAHAL, P., BLIZZARD, L., VAN DER MEI, I., TAYLOR, B. V., Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: An updated meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(11), 1193–1200, 2019.

SECHI, E., CACCIAGUERRA, L., CHEN, J.,J., MARIOTTO, S., FADDA, G., DINOTO, A., LOPEZ-CHIRIBOGA, A., S., PITTOCK, S., J., FLANAGAN, E., P. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disease (MOGAD): A Review of Clinical and MRI Features, Diagnosis, and Management. **Frontiers Neurology**. 13:885218. 2022.

SHARIPOUR, S., DAVOODI RAD, K. Seroprevalence of Epstein–Barr virus among children and adults in Tehran, Iran. **New Microbe and New Infectology**; 34: 100641; 2020.

SIRITHO, S., PANDIT, L., MATIELLO, M. Editorial: MOGAD, current knowledge and future trends. **Frontiers Neurology**. 14:1283217. 2023.

SIRIRATNAM, P., HUDA, S., BUTZKUENVEN, H., VAN DER WALT, H., JOKUBAITS, V., MONIF, M. A comprehensive review of the advances in neuromyelitis optica spectrum disorder. **Autoimmunity Reviews**, 22, 2023.

SPECTOR, R.; SNODGRASS, S. R.; JOHANSON, E. C.; A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans. **Experimental Neurology**, n.273, p.57-68, 2015.

SCHWARTZ, K., SCHMITZ, F. Synapse Dysfunctions in Multiple Sclerosis. **International Journal Molecular Science**, 24, 1639, 2023.

SCHÜNEMANN et al. GRADE handbook for grading quality of evidence and strength of recommendations. Updated October 2013. **The Grade Working Group**, 2013. Available from [guidelinedevelopment.org/handbook](http://guidelinedevelopment.org/handbook), 2019.

WALTON, C., KING, R., RECHTMAN, L., KAYE, W., LERAY, E., MARRIE, R. A., ROBERTSON, N., LA ROCCA, N., UITDEHAAG, B., VAN DER MEI, I., WALLIN, M., HELME, A., ANGOOD NAPIER, C., RIJKE, N., BANEKE, P., e, P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis**, 26(14), 1816–1821, 2021.

WINGERCHUK, D. M., LENNON, V. A., PITTOCK, S. J., LUCCHINETTI, C. F., WEINSHENKER, B. G., Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. **Neurology**, 66(10): 1485–9 (2006).

WILDEMANN, B., OSCHMANN, P., REIBER, H. Editors. Laboratory diagnosis in neurology. **Stuttgart: Thieme**; 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Multiple Sclerosis International Federation. Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. Geneva: **World Health Organization (WHO)**, p 56, 2008.

WYNFORD-THOMAS, R., JACOB, A., TOMASSINI, V., Neurological update: MOG antibody disease. **Journal of Neurology**, 266:1280–1286, 2019.

TAKAHASHI, T., *et. al.* Establishment of a new sensitive assay for anti-human aquaporin-4 antibody in neuromyelitis optica. **Tohoku Journal of Experimental Medicine**. Dec;210(4):307-13, 2006.

THOMPSON, A., J., *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. **Lancet Neurology**. 17, 162–173, 2018.

ZIMMERMANN, K. KÜHN, H. J., LINKE E. Praktische Liquordiagnostik in Frage und Antwort. **Thieme** 1<sup>a</sup> Ed. 2012.