



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Priscila Mendonça do Sacramento

**Impacto da depressão no perfil fenotípico e funcional das células T de
pacientes com esclerose múltipla: estudo centrado no efeito da serotonina**

Rio de Janeiro

2021

Priscila Mendonça do Sacramento

Impacto da depressão no perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla: estudo centrado no efeito da serotonina

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^a Dra Cleonice Alves de Melo Bento

Coorientadora: Prof^a Dra Claudia Cristina Ferreira Vasconcelos

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S123 Sacramento, Priscila Mendonça do.
Impacto da depressão no perfil fenotípico e funcional das células T de
pacientes com esclerose múltipla: estudo centrado no efeito da serotonina /
Priscila Mendonça do Sacramento – 2021.
138f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento
Coorientadora: Prof.^a Dra. Claudia Ferreira Vasconcelos

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Esclerose múltipla - Teses. 2. Células T- Teses. 3. Depressão - Teses. 4.
Células Th17. 5. Serotonina - Teses. I. Bento, Cleonice Alves de Melo. II.
Vasconcelos, Claudia Cristina Ferreira. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.832-004.2

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Priscila Mendonça do Sacramento

Impacto da depressão no perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla: estudo centrado no efeito da serotonina

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 29 de julho de 2021.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cleonice Alves de Melo Bento

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Coorientadora: Prof.^a Dra. Claudia Cristina Ferreira Vasconcelos

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof. Dr. Pablo Trindade

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Régis Mariano de Andrade

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Renato Geraldo da Silva Filho

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Às minhas estrelas, que vibram e emanam energias positivas lá do céu, - meu pai Antônio e minha avó Joana.

À minha avó Antônio e seu amor incondicional.

Aos queridos pacientes voluntários, que acreditam no poder da ciência e contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que possibilitou a minha chegada até aqui e todo dia me sustenta com seu amor grandioso e sua misericórdia divina. A Maria Santíssima, aos santos, aos anjos, aos guias, por interceder por mim e pelos meus, juntos ao Pai.

A meus avós, que tanto me ensinaram a lutar pelos meus sonhos, a não desistir, a correr atrás do que me faz sentir realizada e completa. Em especial, a minhas avós Joana e Tuninha, e ao meu avô Mendonça. Obrigada por tudo, por cada momento que me proporcionaram e me proporcionam, por todo apoio, amor, incentivo e confiança.

Aos meus pais, Antônio e Rita, por toda educação que me proporcionaram, por todo cuidado, carinho, zelo, amor, inspiração, confiança. Sinto-me honrada por ser filha de vocês.

Ao meu pai que, mesmo longe, se fez presente em cada momento desde a sua partida. A minha mãe, seu suporte foi crucial para eu chegar até aqui. Eu amo vocês! Muito obrigada por tudo!

As minhas irmãs, Sheila e Talita, que me completam e me impulsionam todos os dias. Os maiores presentes que meus pais me deram. Sou eternamente grata por ter vocês na minha vida. Obrigada por todo amor, carinho, apoio, amizade.

A minha família materna e paterna, em especial minha tia Claudia e meu tio Toinho, por todo apoio, zelo e amizade. Ter vocês em minha vida torna essa jornada mais leve. A minha tia Consuelo e meu tio Joãozinho, minha gratidão! Obrigada pela torcida, pela compreensão, pelo exemplo de luta e pelo amor incondicional.

A meu namorado, David, pelo amor, amizade, respeito, companheirismo e zelo. Suas palavras me impulsionam a sempre buscar o que mereço. A minha sogra, Davies, por toda ajuda e por todo carinho.

A minha orientadora, Cléo, por tudo que vivemos desde a minha iniciação científica. Obrigada por cada momento que me fez evoluir como pessoa e como profissional. Ter te conhecido e poder compartilhar momentos com você foram grandes achados extremamente significativos. Você é uma grande fonte de inspiração para todos que te rodeiam.

A minha coorientadora, Dra Claudia, por todo suporte, conhecimento compartilhado e carinho. Esses anos acompanhando o ambulatório de Neurologia foram incríveis e de muito aprendizado.

A minhas amigas, Clarice, Aleida e Lana, presentes do LIILiT, por cada palavra de estímulo, de conforto. Obrigada por nunca soltarem minha mão e se fazerem presentes em cada momento da minha vida.

A Aleida, por ter me presenteado com uma linda e abençoada sobrinha – a Lia. Uma fonte de amor inesgotável.

A família LIILiT, em especial Taíssa e Joana, por todo aprendizado que pude consolidar nesses anos. Taíssa, um ser de luz que me faz melhorar cada dia mais, como pessoa e profissional. A todos do grupo, minha eterna gratidão.

A Marisa, minha companheira de projeto, por todo companheirismo e todo aprendizado que pudemos trocar nesse período. Minha gratidão.

A Mila, minha conterrânea, que me estimula a enfrentar grandes desafios e a evoluir.

A minha grande amiga Najara, uma grande-irmã, presente em todos os momentos da minha vida no Rio, por todo apoio, amor, carinho e zelo. Sua amizade e sua irmandade me fizeram mais forte. Obrigada por tudo!

A meus amigos de escola, em especial a minha professora Maísa, por todo apoio e carinho. Sua amizade e seu bem-querer me fortalecem e me impulsionam todos os dias.

A Valdiná, uma querida amiga, fonte de inspiração e exemplo de luta e dedicação.

A todos supracitados, que eu possa ter retribuídos todo meu carinho e amor por vocês em ações e palavras. Sou eternamente grata por terem vocês na minha vida.

A todos do Programa de Pós-graduação, em especial Carla, uma funcionária de altíssima excelência, pronta para sempre nos ajudar. A todos os professores, que compartilharam suas experiências de vida e profissional, e que puderam contribuir com o meu aprendizado. Vocês são as nossas joias raras. Obrigada por tudo!

A todas as agências de fomento – Capes, CNPq, FAPERJ, Unirio – que possibilitaram a minha permanência na pesquisa e a realização desse projeto.

A todas as pessoas que passaram na minha vida e se foram ou permaneceram e que, de alguma forma, contribuíram para a minha evolução espiritual.

Aos queridos pacientes do ambulatório de Neurologia, que acreditaram na ciência e contribuíram para que esse projeto, que tanto amo, se concretizasse. Ser cientista não é fácil, mas saber que podemos contribuir de alguma forma para a melhora da qualidade de vida de vocês é recompensador. Obrigada por cada troca que tivemos nesses anos! Foi uma experiência incrível que levarei para a eternidade.

Um passo à frente e você já não está no mesmo lugar.

Chico Science

RESUMO

SACRAMENTO, Priscila Mendonça do. **Impacto da depressão no perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla**: estudo centrado no efeito da serotonina. 2021. 138 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune crônica desmielinizante do sistema nervoso central mediada por células T mielina-específicas, principalmente dos subtipos Th17. A gravidade da doença tem sido associada a vários fatores ambientais, tal como a ocorrência de depressão maior (TDM), um transtorno de humor comumente diagnosticado em pacientes com EM e associado ao risco de recaídas clínicas. Sabendo que o TDM tem sido associado a menor produção de serotonina (5-HT), um neurotransmissor com ações imunomoduladoras, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o impacto tanto do TDM quanto da 5-HT em modular o status funcional de células T efetoras e reguladoras (Treg) de pacientes com EM seguindo estimulação *in vitro* com mitógenos e a proteína básica da mielina (PBM). Enquanto o perfil de citocina e a resposta proliferativa foram avaliados, respectivamente, através de ELISA/Luminex e captura de timidina tritiada, o perfil fenotípico foi determinado via citometria de fluxo. No primeiro artigo, conduzido em pacientes com EM e sem TDM, nós demonstramos que a 5-HT foi capaz de diminuir a produção de citocinas relacionadas ao perfil Th17 e aumentar a frequência de células Treg CD39⁺IL-10⁺. Ademais, a 5-HT aumentou a capacidade supressiva das células Tregs clássicas em sistemas de cocultura com células T efetoras. No segundo artigo, a ocorrência de TDM potencializou a produção de citocinas relacionadas ao perfil Th17 no plasma e nas culturas de células estimuladas com mitógenos ou com PBM. Adicionalmente, a frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ capazes de produzir IL-17, IL-22 e GM-CSF foi maior em pacientes deprimidos. Curiosamente, a porcentagem de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺ e IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ mielina-específicas se correlacionou diretamente com deficiências neurológicas. Em contraste, a ocorrência de TDM não apenas foi associada a menor proporção de subtipos de células TregsCD39⁺ PBM-específicas, como a frequência dessas células correlacionou-se negativamente com a gravidade dos sintomas depressivos e as deficiências neurológicas. Por fim, a adição de 5-HT às culturas de células de pacientes com TDM foi capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas por células T encefalitogênicas. Sendo assim, a depressão aumenta o status inflamatório do paciente com EM e impacta negativamente no compartimento de células Tregs, podendo acarretar no desenvolvimento de novas recaídas clínicas e favorecer um pior prognóstico. Apesar de preliminares, esses achados sugerem que o manejo terapêutico da TDM com drogas antidepressivas à base de inibição de receptação de serotonina pode ajudar a reduzir a atividade radiológica e clínica da EM.

Palavras-chave: Depressão. Esclerose Múltipla. Serotonina. Células Th17. Células Treg. Citocinas. CD39. CTLA-4.

ABSTRACT

SACRAMENTO, Priscila Mendonça do. **Impact of depression on the phenotypic and functional profile of MS patients-derived T cells:** a focused study on the role of serotonin. 2021. 138 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic demyelinating autoimmune disease of the central nervous system mediated by myelin-specific T cells, mainly Th17 subtypes. Disease severity has been associated with several environmental factors, such as the occurrence of major depression (MDD), a mood disorder commonly diagnosed in MS patients and associated with the risk of clinical relapses. Knowing that MDD has been associated with lower production of serotonin (5-HT), a neurotransmitter with immunomodulatory actions, the aim of the present work was to evaluate the impact of both MDD and 5-HT in modulating the functional status of effector and regulatory (Treg) cells of MS patients following in vitro stimulation with mitogens and myelin basic protein (MBP). While cytokine profile and proliferative response were evaluated, respectively, by ELISA/Luminex and tritiated thymidine capture, the phenotypic profile was determined by flow cytometry. In the first article, conducted in MS patients and without MDD, we demonstrated that 5-HT was able to decrease the production of Th17-related cytokines profile and to increase the frequency of CD39⁺IL-10⁺ Treg cells. Furthermore, the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells capable of producing IL-17, IL-22 and GM-CSF was higher in depressed patients. Interestingly, the percentage of MBP-specific IFN- γ ⁺IL-17⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ CD4⁺ T cells correlated directly with neurological disorder. In contrast, the occurrence of MDD was not only associated with a lower proportion of MBP-specific CD39⁺ Tregs cell subtypes, but the frequency of these cells was negatively correlated with the severity of depressive symptoms and the neurological impairments. Finally, the addition of 5-HT to cell cultures of patients with MDD was able to reduce the production of pro-inflammatory cytokines produced by encephalitogenic T cells. Thus, depression increases the inflammatory status of MS patients and negatively impacts the Treg cell compartment, which may lead to the development of new clinical relapses and favor a worse prognosis. Although preliminary, these findings suggest that therapeutic management of MDD with serotonin reuptake-inhibiting antidepressant drugs may help to reduce the radiological and clinical activity of MS.

Keywords: Depression. Multiple Sclerosis. Serotonin. Th17 cells. Treg cells. Cytokines. CD39. CTLA-4.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Sistemas funcionais avaliados no âmbito da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês Expanded Disability Status Scale).....	18
Quadro 2 –	Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS).....	19
Quadro 3 –	Terapias modificadoras da doença e seus mecanismos de ação.....	27
Tabela 1 –	Componentes serotoninérgicos nas células imunes.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indol-acético
5-HT	5-hidroxitriptamina – serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HTR	Receptor da serotonina
5-HTT	Transportador de serotonina (do inglês <i>serotonin transporter</i>)
AVD	Atividades de vida diária
BDI	Inventário de Depressão de Beck (do inglês <i>Beck Depression Inventory</i>)
BHE	Barreira hematopoiético
CD	Cluster de diferenciação
CE	Células enterocromafínicas
CIS	Síndrome clínica isolada (do inglês <i>Clinically isolated syndrome</i>)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
CR	Cadeira de roda
CTLA-4	do inglês <i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DC	Células dendríticas (do inglês <i>dendritic cells</i>)
EAE	Encefalomielite aguda experimental
EDSS	Escala do Estado de Disabilidade Expandida (do inglês <i>Expanded Disability Status Scale</i>)
EM	Esclerose Múltipla
EM-PP	EM forma primária-progressiva
EM-RR	EM forma remitente-recorrente
EM-SP	EM forma secundária-progressiva
FoxP3	Fator de transcrição (do inglês <i>forkhead box protein 3</i>)
FS	Sistemas funcionais (do inglês <i>functional systems</i>)
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>).
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano (do inglês <i>Human Leukocyte Antigen</i>)
IDO	Indoleamina 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleucina

LAMP-1	Proteína de membrana associada ao lisossomo 1 (do inglês <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>)
LPS	Lipopolissacarídeo
MAO	Monoamina Oxidase A (do inglês <i>monoamine oxidase A</i>)
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MDD	<i>Major depressive disease</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	<i>Multiple sclerosis</i>
PBM	Proteína básica da mielina
PCR	Proteína C reativa
RIS	Síndrome radiológica isolada (do inglês <i>Radiologically isolated syndrome</i>)
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RR	Forma remitente-recorrente da EM
S1P	Esfingosina-1-fosfato (<i>sphingosine-1-phosphate</i>)
SERT	Transportador da receptação da serotonina (do inglês <i>Serotonin reuptake transporter</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SSRI	Inibidores Seletivos da Recaptação da serotonina (do inglês <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitors</i>)
Tc	Células TCD8 ⁺ citotóxicas
TDM	Transtorno Depressivo Maior
TDO	Do inglês <i>tryptophan 2,3-dioxygenase</i>
TGI	Trato Gastrointestinal
Th	Células T CD4 ⁺ <i>helper</i> /efetoras
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i> (do inglês <i>Toll-like receptors</i>)
TMD	Terapia modificadora da doença
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês <i>Tumor Necrosis Fator</i>)
TPH	Triptofano hidroxilase
Tr1	Células T reguladoras 1
Tregs	Células TCD4 ⁺ reguladoras

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	OBJETIVOS	35
1.1	Geral	35
1.2	Específicos	35
2	ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	37
2.1	Artigo 1 – Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4+ T cell subsets in multiple sclerosis patients (Artigo Publicado).....	37
2.2	Artigo 2 – Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39+Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients (Artigo submetido).....	50
3	DISCUSSÃO	107
	CONCLUSÕES.....	114
	REFERÊNCIAS.....	115
	ANEXO A – Inventário de depressão de Beck	134
	ANEXO B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	136

INTRODUÇÃO

Considerações gerais

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica do Sistema Nervoso Central (SNC), com curso clínico heterogêneo, caracterizada pela inflamação e a consequentemente desmielinização no parênquima cerebral, degeneração axonal e gliose (Deck *et al.*, 2013). É uma doença causada pela complexa interação entre fatores genéticos e ambientais (Lill, 2014), e afeta mais de 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo (MSIF, 2020).

A EM é a principal causa de incapacidade neurológica crônica em adultos jovens (20-40 anos), tendo, portanto, um forte impacto socioeconômico (Cores *et al.*, 2014). Apesar de a doença poder seguir diferentes cursos após o diagnóstico definitivo, a maioria dos pacientes com EM (85% - 90%) apresenta a forma recorrente-remitente (RR), caracterizada por recaídas clínicas seguidas de remissões parciais ou totais (Deck *et al.*, 2013).

Acredita-se que a EM desenvolva-se em face a deficiências funcionais das células T CD4⁺ reguladoras (Tregs) envolvidas na manutenção da tolerância imune (Piédavent-salomon *et al.*, 2015; Haas *et al.*, 2005) associada à predisposição genética, principalmente a expressão de certos alelos do complexo de histocompatibilidade principal (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) capazes de apresentar peptídeos de proteínas da bainha de mielina (Canto & Oksenberg, 2018; Li *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 1998; Jersild *et al.*, 1972). Muitos estudos têm demonstrado uma participação importante na patogênese da EM das células T CD4⁺ e T CD8⁺ específicas para antígenos da bainha de mielina, capazes de produzir elevados níveis de IFN- γ e IL-17, e também das células B, associada a um dano nas células Tregs (Gharagozloo *et al.*, 2018; Lassmann & Ransohoff, 2004; Skulina *et al.*, 2004; Babbe *et al.*, 2000). A IL-17 e o IFN- γ , assim como outras citocinas associadas ao fenótipo Th17, tais como IL-22 e GM-CSF, têm sido implicadas na ativação de diferentes células da imunidade inata envolvidas na destruição da bainha de mielina dentro do SNC das pacientes com EM (Wing *et al.*, 2016; Azizi *et al.*, 2015; Mirshafiey *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Codarri *et al.*, 2011).

Apesar do reconhecimento do envolvimento dos linfócitos T na EM, a progressão da doença é muito variada entre os indivíduos e isso pode estar relacionado a vários fatores extrínsecos e intrínsecos, tal como o estresse e a depressão, que impactam no comportamento

funcional das células imunes desses pacientes (Deck *et al.*, 2013). No contexto da EM, estudos indicam que eventos psicológicos adversos, como a depressão, podem servir como gatilhos para o desenvolvimento da doença e/ou recaídas clínicas (Schumann *et al.*, 2012; Mohr *et al.*, 2004).

A depressão apresenta um impacto negativo severo em pessoas com EM (Watson *et al.*, 2014), uma vez que pode prejudicar componentes-chaves da imunidade celular, tornando o indivíduo não apenas mais susceptível a doenças infecciosas (Benton *et al.*, 2010), como também influenciar o curso clínico da doença (Kim, 2012). A depressão é um transtorno de humor comumente diagnóstico nos pacientes com EM e a desregulação na circuitária bioquímica cerebral desses pacientes, tal como a produção insuficiente de serotonina, pode favorecer episódios de recaídas clínicas (Beiske *et al.*, 2008; Mohr *et al.*, 2004).

Muitos dos efeitos deletérios da depressão na imunidade estão atrelados a distúrbios na produção de importantes neurotransmissores, tal como a serotonina (5-HT – 5-hidroxitriptamina), que tem sido implicada na fisiopatologia da depressão. Sabe-se que linfócitos T são capazes de expressar diferentes subtipos de receptores para a 5-HT (Snir *et al.*, 2013; Khan & Ghia, 2010; Stefulj *et al.*, 2000) e, portanto, as funções das células T podem ser moduladas por esse neurotransmissor. Além disso, estudos que mostrem o perfil funcional e fenotípico dos linfócitos nos pacientes com EM e depressão estão faltando.

Esse tipo de estudo pode ajudar na compreensão da dinâmica das células imunes, em especial do fenótipo T, no contexto da EM e da depressão; da modulação da serotonina nessas células dos pacientes que possuem sintomas depressivos; e do impacto da depressão na progressão da EM, evidenciado pelo acúmulo de incapacidades neurológicas.

Esclerose Múltipla

Primeiramente descrita por Jean-Martin Charcot, em 1868, a Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune inflamatória crônica, que acomete o sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela neuroinflamação, desmielinização dos neurônios e perda axonal (Reich *et al.*, 2018; Thompson *et al.*, 2018). O processo inflamatório que leva à destruição da bainha de mielina dos neurônios é desencadeado principalmente pelos linfócitos T autorreativos e também pelas células B (Reich *et al.*, 2018; Mishra & Wee Yong, 2016).

Estudos tem mostrado que a EM é uma doença que se manifesta de forma bifásica, apresentando a fase inflamatória e a fase neurodegenerativa. A doença é caracterizada por duas características patológicas: - a inflamação que leva à desmielinização, e - a proliferação astrogliar (astroglíose), acompanhada da neurodegeneração (Hauser *et al*, 2020). Embora o processo de inflamação seja tipicamente associado com as recaídas clínicas e a neurodegeneração com a progressão, ambos os processos ocorrem concomitantemente em todos os pacientes no decorrer da doença em diferentes níveis (Hauser *et al*, 2020).

Atualmente, existem 2,8 milhões de pessoas com EM no mundo. É uma doença que tem início normalmente em adultos com 20-50 anos de idade (NMSS, 2006), porém no Atlas da Esclerose Múltipla 2020 (MSIF, 2020), estima-se que cerca de 30.000 indivíduos são menores de idade, indicando o aumento da incidência em adolescentes. O Brasil possui cerca de 40.000 indivíduos diagnosticados com EM, sendo a prevalência de 19 a cada 100.000 habitantes (MSIF, 2020). A EM é mais comum em caucasianos que em outros grupos étnicos, e as mulheres são, aproximadamente, 3 vezes mais afetadas do que os homens (Alves-Leon *et al.*, 2008; Koch *et al.*, 2014).

A progressão da EM é caracterizada pela injúria axonal, formação de placas na substância branca e desmielinização decorrente da inflamação, que normalmente pode acometer a medula espinhal, nervo óptico, tronco cerebral e regiões periventriculares (Sormani *et al*, 2013; Thompson *et al*, 2010). A desmielinização da massa branca e cinzenta difusa resulta, a longo prazo, na diminuição do volume cerebral (Wanleenuwat & Iwanowski, 2019).

O diagnóstico da doença é realizado baseando-se nos critérios de McDonald revisados e adaptados, e exige evidência objetiva da resposta inflamatória no SNC e sua disseminação do processo da doença “no tempo e no espaço” – afetando mais de um local do SNC com evolução ao longo do tempo (Hauser *et al*, 2020). Os testes que corroboram com o diagnóstico são a ressonância magnética e as análises do fluido cerebrospinal, além dos testes clínicos. Na maioria dos pacientes, observa-se uma ressonância magnética anormal, com regiões densas e acinzentadas (Filippi *et al*, 2016). As lesões captantes de contraste – o gadolínio – são decorrentes da quebra da barreira hematoencefálica que permite que o gadolínio intravenoso alcance o SNC, possibilitando assim marcar locais de inflamação aguda (Hauser *et al*, 2020). Alterações no líquido incluem pleocitose de células mononucleares e um aumento do nível de IgG sintetizado intratecal (que pode ser considerado disseminação no tempo uma vez que o paciente já tenha manifestado o primeiro episódio clínico). A presença

de bandas oligoclonais de IgG no líquido refletem os produtos de uma resposta imune altamente focada por células B ativadas no SNC.

Os pacientes podem manifestar diferentes sintomas, que duram mais de 24 horas e ocorrem episódios distintos intercalados por pelo menos 1 mês, com diferentes intensidades - de forma leve a grave. As manifestações clínicas podem ocorrer de forma isolada ou simultânea, sendo, as mais comuns, parestesia de membros, neurite óptica, disfunções de coordenação, esfinterianas, cognitivo-comportamentais, dentre outros (Latimer-Cheung *et al*, 2013). Os sintomas apresentados pelo paciente, na maioria das vezes, serão o reflexo da área afetada pelo processo inflamatório e da neurodegeneração (Arneth, 2019).

Nos pacientes, a síndrome clínica isolada (CIS – do inglês *Clinically isolated syndrome*) é a primeira manifestação clínica da doença e se apresenta com desmielinização compatível com a EM na ressonância, porém não cumpre critérios de disseminação no tempo. A síndrome radiológica isolada (RIS – do inglês *Radiologically isolated syndrome*) é mais complexa, porque apresenta características na ressonância magnética sugestivas de EM (desmielinização e inflamação no parênquima cerebral), mas sem sinais nem sintomas clínicos (Okuda *et al*, 2009; Lublin *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2018). Ambas não permitem concluir o diagnóstico da EM, por não atender aos critérios clínicos e radiológicos fundamentais para tal.

O curso clínico da EM é considerado a expressão de dois fenômenos clínicos: episódios agudos dos sintomas neurológicos, que terminam com remissão parcial ou completa, e progressão, que se refere à piora irreversível dos sinais e sintomas, por um período igual ou superior a 6 meses, e ao acúmulo de lesões captantes de contraste. Embora a inflamação seja persistente em ambos os fenômenos, existe forte evidência de que as recaídas clínicas sejam, principalmente, a expressão de inflamação aguda, focal, disseminada (no tempo e espaço) e recorrente no SNC.

Ao longo dos anos, diversas formas de manifestação da doença foram identificadas (Wang *et al*, 2015; Dutta & Trapp, 2011; von Büdingen *et al*, 2010). Uma vez diagnosticada, existem três principais formas clínicas da doença: a remitente-recorrente (EM-RR), a secundária progressiva (EM-SP) e a primária progressiva (EM-PP). A EM-RR é a forma mais comum, sendo presente em 85 a 90% dos pacientes, e é caracterizada por episódios clínicos, com duração maior que 24 horas, intercalados por períodos de remissão/estabilidade parcial ou total (Schumacher *et al.*, 1965). Essa forma clínica afeta duas vezes mais mulheres que homens e 40 a 50% desses pacientes desenvolvem a EM-SP num período de até 10 anos (Lublin *et al.*, 2014). Aproximadamente 10% dos pacientes apresentam a EM-PP,

apresentando uma gradual disfunção neurológica com exacerbações, com ausência de remissão e acúmulo de incapacidades neurológicas (Deck *et al.*, 2013). Normalmente essa forma se inicia dez anos mais tarde quando comparada com a EM-RR e não há predominância quanto ao gênero (Iwanowski & Losy, 2015). Todas as formas clínicas parecem ter o mesmo processo patológico da doença, embora se manifestem com intensidade diferente (Lublin *et al.*, 2014).

Além da classificação quanto à forma clínica da EM, atualmente, visando fins terapêuticos e acompanhamento clínico para melhor prognóstico, a forma clínica pode ser classificada também em ativa ou não-ativa. A forma ativa normalmente se mostra refratária aos tratamentos, levando a um acúmulo de incapacidades neurológicas, decorrentes dos episódios clínicos recorrentes com intervalos mais curtos e recuperação parcial, e/ou de novas lesões captantes de contraste (Bowen, 2019). Aproximadamente 4 a 15% dos pacientes possuem a forma altamente ativa da doença desde seu início (Dáz *et al.*, 2019).

Com base na evolução, os pacientes com EM são estadiados de acordo com a avaliação dos sistemas funcionais (FS – do inglês *functional systems*) (Quadro 1) utilizando-se a escala chamada Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês *Expanded Disability Status Scale*) (Quadro 2), que mede o acúmulo de incapacidade neurológica do paciente (Kurtzke, 1983). Essa escala é composta por vinte itens com valores de 0 a 10, sendo que a pontuação tem um incremento de meio ponto conforme o grau de incapacidade do paciente aumenta (Jokubaitis *et al.*, 2016). O maior enfoque dado é a capacidade de deambulação do paciente, principalmente se o EDSS for maior que 4. Nessa escala, 0 indica ausência de déficit neurológico enquanto que 10 indica morte em decorrência da EM, o que é muito raro.

Quadro 1 - Sistemas funcionais avaliados no âmbito da Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS – do inglês *Expanded Disability Status Scale*)

✓ Funções Piramidais - movimentos voluntários
✓ Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face e deglutir
✓ Funções Visuais (ou Ópticas)
✓ Funções Cerebrais (ou Mentais) - memória, concentração, humor
✓ Funções Sensitivas
✓ Funções Intestinais e Vesicais
✓ Outras Funções - incluindo a fadiga

Fonte: Chaves, M.L.F., Finkelsztejn, A., Stefani, M.A. Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia. Porto Alegre. Artmed, 2008. Capítulo "Escala em Neurologia".

Quadro 2 - Escala Expandida do Estado de Incapacidade (EDSS)¹

0.0	- Exame neurológico normal (FS grau 0).
1.0	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS (1 FS 1).
1.5	- Nenhuma deficiência, sinais mínimos em 1 FS, excluindo função cerebral grau 1 (mais de 1 FS 1).
2.0	- Deficiência mínima em 1 FS (1 FS 2, outros 0 ou 1).
2.5	- Deficiência mínima em 2 FS (2 FS 2, outros 0 ou 1).
3.0	- Deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3, outros 0 ou 1) ou deficiência leve em 3 ou 4 FS (3 ou 4 FS 2, outros 0 ou 1), embora com marcha livre.
3.5	- Marcha livre, mas com deficiência moderada em 1 FS (1 FS 3) e 1 ou 2 FS 2, ou 2 FS 3, ou 5 FS 2 (outros 0 ou 1).
4.0	- Marcha livre sem órtese, independente, por 12 h/dia apesar de deficiência relativamente severa de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores excedendo os limites dos passos anteriores, capaz de andar sem auxílio e sem descanso por 500 metros.
4.5	- Marcha livre sem auxílio durante grande parte do dia, capaz de trabalhar o dia todo, pode, contudo, ter alguma limitação para atividade livre ou requerer mínima assistência; caracterizado por deficiência relativamente severa consistindo de 1 FS 4 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores e marcha livre por 300 metros.
5.0	- Marcha livre por 200 metros; deficiência severa atrapalhando as atividades diárias; geralmente 1 FS 5 (outros 0 ou 1) ou combinações de graus menores.
5.5	- Marcha livre por 100 metros; deficiência severa para impedir as Atividades de Vida Diária (AVD), (1 FS 5, outros 0 ou 1).
6.0	- Auxílio intermitente ou unilateral (bengala, muleta, aparelho tutor, órtese) necessário para andar 100 metros com ou sem descansar (+ de 2 FS 3).
6.5	- Auxílio bilateral constante para andar 20 metros (+ de 2 FS 3).
7.0	- Incapaz de andar 5 metros mesmo com auxílio, necessita de cadeira-de-rodas (CR) comum e faz transferência sozinho, toca a CR por 12 h/dia (= de 1 FS 4; muito raramente só 1 FS 5).
7.5	- Incapaz de andar mais que poucos passos, restrito à CR, pode precisar de auxílio para transferência, toca a CR, mas não pode se manter na CR comum o dia todo. Pode necessitar de CR motorizada (+ de 1 FS 4+).

8.0	- Essencialmente restrito ao leito ou CR, pode ficar na CR boa parte do dia, mantém muitos cuidados pessoais, geralmente tem o uso efetivo dos membros superiores (FS 4 em muitos sistemas).
8.5	- Restrito ao leito boa parte do dia, tem alguma função de membros superiores; mantém alguns cuidados pessoais (FS 4 em vários sistemas).
9.0	- Dependente no leito; pode se comunicar e se alimentar (FS 4 na maioria).
9.5	- Totalmente dependente no leito, incapaz de deglutir ou se alimentar (todos os FS 4 ou 5).
10,0	- Morte por Esclerose Múltipla

¹ (do inglês *Expanded Disability Status Scale*) Fonte: Chaves, M.L.F., Finkelsztejn, A., Stefani, M.A. Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia. Porto Alegre. Artmed, 2008. Capítulo "Escala em Neurologia".

Dois modelos etiológicos são propostos. O primeiro acredita que a EM seja causada principalmente pelas respostas exacerbadas das células imunes nos órgãos linfoides secundários, como linfonodos e baço. Essa superativação e infiltração das células T e B autorreativas no SNC provoca a desmielinização progressiva causada pela inflamação (Gharagozloo *et al*, 2018). Graças a esse modelo, várias terapias modificadoras da doença foram desenvolvidas (Martin *et al*, 2016).

O outro modelo baseia-se na ideia de que o início da EM seja decorrente de processos neurodegenerativos, dos quais a injúria neuronal e/ou morte de oligodendrócitos inicia a inflamação no SNC, na ausência de um ataque direto do sistema imune (Gharagozloo *et al*, 2018; Stys *et al*, 2012; Barnett & Prineas, 2004). Essa inflamação acaba expondo antígenos do SNC, que são levados para os órgãos linfoides e, conseqüentemente, ativam células T e B autorreativas (Stys *et al*, 2012). Em ambos os modelos, há inflamação em todas as fases da doença. A inflamação consiste da infiltração de células imunes periféricas no SNC e/ou na ativação de células residentes no SNC, incluindo micróglia e astrócitos. As respostas da imunidade inata e adaptativa são envolvidas na potencialização da doença neuroinflamatória desmielinizante na EM (Thompson *et al*, 2018).

Sendo assim, a EM é uma doença caracterizada por lesões multifocais no SNC associadas a infiltração de células do sistema imune e que causam desmielinização, degeneração axonal e perda dos oligodendrócitos (Adams & Victor, 1989; Fassas & Mancardi, 2008; Vosoughi & Freedman, 2010; Kieseier, 2014). Essas lesões podem ser identificadas macroscopicamente por ressonância magnética (RM) do crânio como placas cinzas, de tamanhos variados e com limites imprecisos, além de se notar atrofia cerebral com

alargamento dos ventrículos laterais (Minguetti, 2001; Adams & Victor, 1989), resultado de processos inflamatórios no SNC, responsáveis pela patogênese da doença.

Imunopatogênese da EM

A Esclerose Múltipla é uma doença complexa, multifatorial, cuja patogênese envolve a interação de vários compartimentos do sistema imune, que podem sofrer modulações por fatores ambientais. A interação entre as células T, principalmente as células TCD4⁺, e as células B, e a migração dessas células mielina-específicas para o SNC, interagindo com as células residentes, como a micróglia e os astrócitos, estimulam e mantêm um processo inflamatório neurodegenerativo, com intensa desmielinização e perda axonal (Lazibat *et al*, 2018; Li *et al*, 2018; Matsui, 2008). A contribuição da neuroinflamação nesse processo tem sido evidenciada pela observação de efeitos benéficos no curso clínico da doença, após a administração de drogas anti-inflamatórias e imunomoduladoras, embora essas ainda sejam incapazes de reverter a progressão da doença (Dargahi *et al.*, 2017; Ghasemi *et al.*, 2017).

A correlação de fatores ambientais, como as infecções, ao desenvolvimento da resposta inflamatória na EM se dá por dois mecanismos que podem levar à ativação de células T autorreativas através de peptídeos virais: o mimetismo molecular e ao dano funcional na inflamação. O mimetismo molecular entre proteínas virais e peptídeos da mielina está associado com a constituição genética do indivíduo, atrelado à presença dos alelos HLA-DR2 e HLA-DR15 (Sospedra, 2005). Os fatores ambientais associados à predisposição genética favorecem a perda da tolerância imune e, conseqüentemente, a ativação de células T mielina-específicas, que atacam as proteínas da bainha de mielina e dos oligodendrócitos, levando à desmielinização e danos neuronais.

O desenvolvimento de modelos animais que desenvolvem patologias semelhantes às dos seres humanos, traduzindo importantes doenças e mimetizando o processo imunopatológico, é um grande avanço, pois possibilita a melhor compreensão dos eventos imunes que levam ao seu desenvolvimento e à construção de estratégias terapêuticas. O modelo animal de EM – a encefalomielite autoimune experimental (EAE) –, tem permitido avanços na compreensão de mecanismos celulares e moleculares relacionados à EM, bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, tendo como alvo pontos-chaves da resposta inflamatória.

Em camundongos, o desenvolvimento da EAE decorre da ativação de linfócitos T autorreativos contra peptídeos da bainha de mielina. Esses linfócitos, então, expressam moléculas de adesão e receptores de quimiocina, favorecendo seu deslocamento para o SNC (Kebir *et al*, 2009). Antes, acreditava-se que apenas as células Th1 fossem responsáveis pela patogênese da EM e da EAE, porém a deficiência de genes relacionados a mediadores inflamatórios produzidos por essas células [interleucina (IL)-2 e interferon-gama (IFN- γ)] não foi capaz de impedir o desenvolvimento de uma forma severa da doença nos camundongos (Becher *et al*, 2002; Chu *et al*, 2000; Ferber *et al.*, 1996; Willenborg *et al.*, 1996; Lublin *et al.*, 1993). Com isso, outro fenótipo estava implicado de forma essencial na patogênese da doença. Por sua vez, camundongos deficientes em IL-23 ou IL-6 – citocinas envolvidas na diferenciação das células Th17 patogênicas –, foram resistentes à EAE (Lee *et al*, 2017; Langrish *et al.*, 2005; Cua *et al.*, 2003; Okuda *et al.*, 1998). Logo, observou-se a grande importância das células Th17 no desenvolvimento e na patogênese da doença.

No ser humano, o processo patológico também envolve a ativação de linfócitos T autorreativos na periferia, que, quando ativados, são capazes de expressar altos níveis de receptores de quimiocina e moléculas de adesão na sua superfície, o que favorece a sua ligação à barreira hematoencefálica (BHE). Além disso, esses linfócitos são capazes de produzir metaloproteinases de matriz que criam canais na BHE, alterando sua permeabilidade e, com isso, possibilitando a entrada de células imunes periféricas no SNC (Arneth, 2019). Ao alcançarem o parênquima cerebral, esses linfócitos são reapresentados às proteínas da bainha de mielina pela micróglia e iniciam a produção de citocinas pro-inflamatórias, que também contribuem com a alteração da permeabilidade da BHE e com o recrutamento de células imunes para o local (Matsui, 2008; Prat & Martin, 2002). Com isso, a ativação das células T autorreativas, em especial os fenótipos Th1/Tc1 e Th17/Tc17, e todo o processo inflamatório comandado por elas, mostram-se eventos chaves na formação das lesões inflamatórias no SNC, que podem ser vistas através da RM com contraste e que é responsável pela manifestação clínica nos pacientes.

As citocinas produzidas pelas células T *helper* (Th)1 contribuem para o dano neuronal em humanos. No sangue periférico de pacientes com EM-RR em surto clínico, altos níveis de IL-12 e IFN- γ foram detectados e correlacionados com a incapacidade neurológica (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009; Skurkovich *et al.*, 2001). Os níveis de IFN- γ foram abundantes nas lesões cerebrais de camundongos com EAE (Merril *et al*, 1992) e também nas lesões ativas dos pacientes com EM (Lock *et al*, 2002).

O envolvimento do fenótipo Th17 na EM tem sido demonstrado em vários estudos. Altos níveis de mRNA para a IL-17 foram detectados nas lesões dos pacientes com EM (Lock *et al.*, 2002; revisto por Lovett-Racke *et al.*, 2011; Matusevicius *et al.*, 1999). Durante as recaídas clínicas, pacientes com EM-RR apresentaram alta produção de IL-17 e IL-6 pelas células mononucleares (Matusevicius *et al.*, 1999) e aumento da frequência de células Th17 no líquido (Brucklacher-Waldert *et al.*, 2009), encontrados também na doença ativa (Tzartos *et al.*, 2008). Logo, o envolvimento de células Th1 e Th17 e, mais recentemente, de linfócitos Th17.1, que produzem citocinas de ambos os fenótipos e são mais patogênicos, são cruciais para os eventos patológicos na EM (Capone *et al.*, 2019). Essas células também são capazes de produzir GM-CSF e IL-22, citocinas relacionadas a maior patogenicidade desse fenótipo no modelo EAE (Volpe *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2012).

O GM-CSF (do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), um fator de crescimento hematopoiético, está envolvido na patogênese da EM. Na EAE, essa citocina mostrou ser essencial no desenvolvimento e na gravidade da doença, bem como na ativação e proliferação da micróglia (Codarri *et al.*, 2011; Ponomarev *et al.*, 2007). Camundongos deficientes em GM-CSF mostraram ser resistentes à EAE, o que pode ser justificado pelo prejuízo na migração de uma população de células dendríticas (DC – do inglês *dendritic cells*) CD103⁺ langerina⁺, que estimula a expansão de células T mielina-específicas produtoras de IFN- γ e IL-17 (King *et al.*, 2010). Em pacientes sem tratamento, elevada produção de GM-CSF foi observada em culturas de células T. Além disso, foi observado, nas lesões cerebrais, elevado número de células TCD4⁺ e TCD8⁺, ambas GM-CSF⁺ (Rasouli *et al.*, 2015). De forma interessante, células T capazes de produzir simultaneamente IL-17, IFN- γ e GM-CSF mostraram ter um potencial altamente encefalitogênico (Basdeo *et al.*, 2017; Muranski & Restifo, 2013).

O envolvimento da IL-22 na patogênese da doença tem sido descrito. A IL-22, juntamente com a IL-17A, reduz a expressão da ocludina nas células endoteliais da BHE, rompendo as junções oclusivas, e, ao interagir com seu receptor nas células locais, pode elevar a produção de metaloproteinases de matriz, alterando a permeabilidade da BHE (Brambilla, 2019; Perriard *et al.*, 2015; Kebir *et al.*, 2007). Altos níveis de IL-22 foram encontrados no soro dos pacientes com EM durante as recaídas clínicas (Wing *et al.*, 2016; Perriard *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2013), ao passo que, no período de remissão na EAE, a diminuição dessa citocina foi observada (Almolda *et al.*, 2011). Em secções cerebrais de pacientes com EM, a expressão do receptor da IL-22, juntamente com a citocina, foi

observada principalmente nas lesões e predominantemente nos astrócitos (Brambilla, 2019; Perriard *et al*, 2015).

As células TCD8⁺, principalmente as T citotóxicas (c)-1 e Tc17, também executam papel importante na imunopatologia da EM, durante os surtos e na fase neurodegenerativa. Uma forte correlação entre o desenvolvimento de novas lesões no SNC e o nível de infiltração de células TCD8⁺ no parênquima cerebral e medular foi demonstrada (Bjartmar *et al*, 2003; Skulina *et al.*, 2004). Estudos têm evidenciado também importância das células TCD8⁺ MAIT [Mucosal associated invariant T (MAIT)], que são células tecido-residentes inata-like, caracterizado pelo receptor Vα7.2 de célula T invariante e alta expressão de CD161 (CD – cluster de diferenciação) (Willing *et al*, 2018; Restorick *et al*, 2017; Dusseaux *et al*, 2011).

Apesar de a maior contribuição na patogênese da doença ser derivada das células T, as células B tem sido fortemente evidenciada pela sua relação com a atividade e, principalmente, com a progressão da doença para a neurodegeneração. Acredita-se que essa contribuição decorra não apenas de mecanismos dependentes de anticorpos, como a produção de autoanticorpos contra diferentes componentes da mielina, do axônio e dos neurônios, mas também daqueles que corroboram a atividade dos linfócitos T. São eles: a apresentação de antígenos e coestimulação dessas células (Lisak *et al*, 2012), a secreção de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo com a proliferação de células T CD4⁺ autorreativas, e a formação ectópica de estruturas semelhantes a folículos (Jelcic *et al*, 2018), contribuindo com a desmielinização e o dano axonal (Li *et al*, 2018; Cross *et al*, 2006; Monson *et al*, 2005); além de produzir fatores neurotóxicos solúveis desencadeando a desmielinização (Lassmann, 2019).

Além da participação ativa das células T e B no processo inflamatório da EM, assim como em outras doenças autoimunes, defeitos numéricos e funcionais no compartimento de células Tregs têm sido observados nesses pacientes. Alguns estudos não identificaram alterações numéricas de células Treg entre indivíduos saudáveis e pacientes com EM (Michel *et al.*, 2008; Venken *et al.*, 2007), porém outros estudos têm mostrado que há um impacto funcional nessas células nos pacientes, uma vez que se mostraram incapazes em diminuir a proliferação e a produção de citocinas pro-inflamatórias pelas células T efectoras mielina-específicas (Falcon, 2009; Ma *et al.*, 2009; Smolders *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2008; Venken *et al.*, 2007, 2008). Nesses pacientes, foram encontrados uma menor expressão intracelular do fator de transcrição FoxP3 (do inglês *forkhead box protein 3*), o que pode justificar esse defeito funcional (Frisullo *et al*, 2009; Venken *et al*, 2008). No SNC, durante as recaídas clínicas, observou-se menores frequências de células FoxP3⁺, o que pode indicar falhas na

migração essas células, decorrente da baixa expressão de adesinas, baixa sobrevivência local ou pelo potencial de transformação dessas células no fenótipo mais patogênico, o Th17 (Venken *et al.*, 2007).

No sangue de pacientes com EM, foram encontradas menores frequências de células Tr-1, células Tregs CD39⁺, células Tregs IFN- γ ⁺ e Tregs foliculares, o que pode levar à exacerbação da resposta das células T efectoras (Dhaeze *et al.*, 2015; Fletcher *et al.*, 2009; Astier *et al.*, 2006). Por outro lado, estudos têm sugerido que as falhas funcionais das células Tregs sejam indiretas, uma vez que possam estar relacionadas com a resistência nas células T efectoras, que expressam elevados níveis do receptor para a citocina IL-7, o CD127, em serem reguladas, devido à elevada produção de citocinas pro-inflamatórias, tais como IFN- γ e TNF- α , (Kaskow & Baecher-Allan, 2018; Kitz *et al.*, 2018; Medrado *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2008). Quando as células T CD4⁺CD127⁺⁺ foram depletadas, *in vivo*, houve o restabelecimento funcional das células Tregs dos pacientes com EM quando comparado ao grupo controle, ou seja, essas células foram igualmente capazes de inibir a inflamação mediada pelas células T efectoras (Medrado *et al.*, 2016; Michel *et al.*, 2008).

Os estudos anteriores mostram que, em relação às células Tregs, defeitos numéricos e funcionais podem estar presentes de forma direta ou indireta. Os defeitos nos mecanismos de regulação estão mais atrelados à resistência das células T efectoras e à elevada produção de citocinas pro-inflamatórias durante as recaídas clínicas dos pacientes, e, possivelmente, não há defeitos na programação gênica quanto à indução ou manutenção dessas células Tregs e, sim, fatores ambientais que podem impactá-las.

Tratamento

As estratégias terapêuticas que têm funcionado na EM são as terapias modificadoras da doença, que têm o objetivo de controlar as recaídas clínicas e a progressão da doença, reduzindo a atividade biológica das células imunes; e a pulsoterapia com glicocorticoides, com o intuito de tratar os sintomas incapacitantes, persistentes por mais de 24 horas, controlando assim as crises agudas da doença (Hauser *et al.*, 2020). Caso haja refratariedade, outra alternativa seria a plasmaferese para remoção de imunoglobulinas do soro dos pacientes. Além do tratamento farmacológico, faz-se necessário o tratamento multidisciplinar dos

pacientes através de manobras que melhorem a qualidade de vida, tais como a reabilitação e apoio psicológico.

Em 1993, a primeira terapia modificadora da doença (TMD) foi introduzida no tratamento da EM (Bowen, 2019). A TMD é realizada com fármacos que modificam o curso da doença, pela supressão ou modulação da resposta imune. Normalmente, as TMD exercem atividade anti-inflamatória na remissão da doença, reduzem a taxa de recaídas clínicas e o acúmulo de lesões na RM, e retardam, em alguns casos, a evolução da doença para a fase neurodegenerativa – a progressiva (Yamout & Alroughani, 2018). Os tratamentos são focados em modular ou diminuir a migração de células inflamatórias, principalmente as células T autorreativas, para o SNC e reduzir, com isso, a resposta inflamatória local que provoca a desmielinização e dano axonal (Kieseier, 2014).

As TMD devem ser criteriosamente escolhidas, levando em consideração a individualidade do paciente, tal como a existência de comorbidades (Farber & Sand, 2015). Dentre as TMD aprovadas para uso na EM e que constam no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla (2020), implementado pelo Ministério da Saúde, temos o interferon (IFN) β -1a e -1b, acetato de glatirâmer, natalizumabe, fingolimoide, teriflunomida e o fumarato dimetila (Quadro 3) (Linker & Gold, 2013). São drogas de primeira escolha terapêutica: betainterferona, acetato de glatirâmer ou teriflunomida ou fumarato de metila. Em caso de falha terapêutica ou intolerância, é permitido a troca por outro medicamento da primeira linha. Na segunda linha, encontra-se o fingolimode, e na terceira linha, o natalizumabe. Um tratamento alternativo é o transplante de células hematopoiéticas autólogas, sendo recomendado apenas para pacientes com EM-RR e que falharam com as TMD (Cohen *et al*, 2019).

Apesar das várias opções terapêuticas, muitos pacientes não respondem de forma eficiente ao tratamento. Essa falha terapêutica pode estar atrelada aos diferentes fatores ambientais, que desregulam diversos fatores endógenos e, assim, podem interferir de alguma forma na patogênese da doença, como a depressão, na qual a concentração de alguns neurotransmissores encontra-se reduzida.

Quadro 3 - Terapias modificadoras da doença e seus mecanismos de ação

Agentes	Mecanismo de ação	Referências
Interferon-beta (IFN- β)	Induz fenótipos T reguladores, ao promover imunomodulação através da expressão negativa das moléculas de MHC na apresentação de antígenos.	(Axtell <i>et al.</i> , 2013)
Polissacarídeo acetato glatiramer	Inibe os fenótipos Th1 e Th17, ao promover a alteração do balanço entre citocinas pro- e anti-inflamatórias.	(Johnson <i>et al</i> , 1998; Aharoni, 2014)
Anticorpo monoclonal natalizumabe	Impede a entrada da célula no SNC, ao inibir a integrina $\alpha 4\beta 1$.	(Kornek, 2015; Lycke, 2015)
Moduladores do receptor da esfingosina 1-fosfato	Bloqueia o receptor da esfingosina-1-fosfato da célula autorreativa, impedindo que os linfócitos T saiam do gânglio linfático.	(Huwiler <i>et al</i> , 2018; Chun & Hartung, 2010)
Dimetilfumarato	Efeitos antiinflamatórios e citoprotetores, através da ativação das vias dependentes e independentes do fator nuclear (eritroide-derivado 2)-tipo 2 (Nrf2)	(Linker & Haghikia, 2016; Scannevin <i>et al</i> , 2012)
Teriflunomida	Imunossupressor potente. Impacta na formação da sinapse imunológica	(Sanofi-Genzyme, 2015; Oh & O'connor, 2014)

Depressão

A depressão, ou transtorno depressivo maior (TDM), é um dos transtornos de humor com alta mortalidade e morbidade no mundo, sendo um problema grave de saúde pública

(Gerhard *et al*, 2016). Estima-se que cerca de 300 milhões de pessoas no mundo apresentem sintomas de depressão (Organização Mundial da Saúde) e que, no Brasil, aproximadamente 5,8% da população sofra de depressão – cerca de 11,5 milhões de casos. Ao longo da vida, acredita-se que 16,6% da população mundial vão desenvolver a depressão (Ledford, 2014; Dunn *et al*, 2015). A porcentagem de anos vividos com incapacidades na depressão é maior que em outras doenças, aproximadamente 10,3% (Smith, 2014).

A depressão é caracterizada por impacto no humor, anedonia, impacto na cognição e na concentração, dentre outros sintomas, que podem refletir na vida não somente dos pacientes, mas também daqueles que os rodeiam (Marchetti *et al*, 2012). A gravidade dos sintomas depende de vários intrínsecos e extrínsecos, como fatores ambientais, que podem corroborar os sintomas e o desenvolvimento de formas mais graves. Através de escalas, é possível avaliar a gravidade dos sintomas depressivos na rotina dos ambulatorios.

O Inventário de depressão de Beck (BDI - Beck Depression Inventory) é um dos instrumentos mais utilizados para avaliar a presença e a intensidade dos sintomas depressivos. Existem 3 versões do questionário, sendo o original publicado em 1961 por Beck e colaboradores e revisado em 1978 – o BDI-IA, e a versão BDI-II publicada em 1996 (Beck *et al* 1993, 1996). O BDI-IA contém 21 itens de múltipla escolha, com 4 afirmações pontuando de 0 a 3. É um questionário autoaplicável, no qual encontram-se os principais sintomas relacionados à depressão: tristeza, desesperança, sentimento de culpa e solidão, irritabilidade, sintomas físicos como fadiga, perda de peso, falta de interesse pelas pessoas e por sexo, dentre outros (Hayden *et al*, 2012; Beck *et al*, 1993).

Pacientes com depressão apresentam níveis das monoaminas diminuídos. Os neurotransmissores da classe das monoaminas – serotonina, dopamina e noradrenalina – têm um papel extremamente importante na regulação do humor e no desenvolvimento de transtornos de humor, como ansiedade/depressão, uma vez que os níveis estejam alterados. Além disso, variações em receptores excitatórios desses neurotransmissores, como o da serotonina – 5-HT_{2A}R, têm sido relacionadas com várias doenças psiquiátricas, incluindo a depressão (Choi *et al*, 2004). Alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, como sensibilidade do receptor para glicocorticoide alterado e aumento da reatividade imune, podem contribuir com a patogênese do TDM (Pariante, 2017).

A etiopatogênese da depressão não se restringe ao SNC, mas apresenta relação com outros sistemas, como o sistema imune e o sistema endócrino (Belmaker & Agam, 2008). Fatores ambientais, como estímulos internos e externos, quebram a homeostase do organismo de forma sistêmica. Sendo assim, o estilo de vida fornece uma base para a disfunção do

sistema imune devido a vários fatores ambientais que podem modulá-lo, e essa disfunção parece ser causada pela disbiose, causada pela alteração da composição da microbiota intestinal, podendo levar à neuroinflamação e à depressão (Evrensel & Ceylan, 2015).

Desordens depressivas estão relacionadas com o estresse agudo e crônico (Pizzagalli, 2014; Slavich & Irwin, 2014). O aumento de citocinas pro-inflamatórias em pacientes com TDM pode induzir a neurotoxicidade (Kim & Won, 2017). Por exemplo, altos níveis das citocinas da tríade inflamatória foram encontrados em pacientes com depressão. No entanto, a IL-6 e a proteína C reativa (PCR) não estavam elevadas em pacientes com depressão virgens de tratamento (Zou *et al*, 2018; Cubala *et al*, 2016). Outros estudos relataram altos níveis de IL-6 em pacientes com TDM (Hung *et al*, 2019; Hodes *et al*, 2016), indicando um caráter inflamatório nessa patologia. A duração desse transtorno, bem como o seu tratamento, pode afetar o perfil desses marcadores inflamatórios e das células imunes. Alguns estudos mostraram que pacientes com depressão apresentam diminuição no número de linfócitos e células NK, e elevado número de células B quando comparados ao controle (Miller, 2010; Robertson *et al*, 2005; Zorrilla *et al*, 2001).

Atualmente, o processo inflamatório tem sido muito implicado no desenvolvimento da depressão, uma vez que diversos fatores ambientais estão direta ou indiretamente relacionados com a exacerbação ou prejuízos da resposta do sistema imune. O sistema imune regula aspectos importantes do desenvolvimento cerebral, da homeostase do SNC, da neurogênese, do humor e do comportamento (de Miranda *et al*, 2017; Fung *et al*, 2017; Brenhouse & Schwarz, 2016; do Prado *et al*, 2016; Zheng *et al*, 2016; Vukovic *et al*, 2012; Marques-Deak *et al*, 2005). Alterações nas funções desse sistema, como aumento das citocinas pro-inflamatórias, proteínas da fase aguda, quimiocinas e moléculas de adesão no sangue periférico e no líquido (Irwin & Miller, 2007; Raison *et al*, 2006), estão implicadas no desenvolvimento da TDM (Miller & Raison, 2016; Mostafavi *et al*, 2014).

As citocinas produzidas no processo inflamatório são consideradas fatores ativadores da via da quinurenina, que levam à exaustão do triptofano, resultando na ativação de processos neuroprogressivos e afetando no metabolismo de vários neurotransmissores (Kowalczyk *et al*, 2019). Além disso, essas moléculas podem alterar a permeabilidade da BHE e induzir uma reação inflamatória, ativando a triptofano 2,3-dioxigenase (TDO - *tryptophan 2,3-dioxygenase*) e as enzimas de degradação da serotonina – a monoamina oxidase (MAO - do inglês *monoamine oxidase*) e a indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), e aumentando a atividade dos transportadores de serotonina presentes na membrana das células e dos neurônios (Vojvodic *et al*, 2019; Müller, 2017; Vogelzangs *et al*, 2012). Logo, a

concentração desse neurotransmissor fica reduzida devido à alteração no sistema triptofano/quinurenina – mais um fator que pode justificar o desenvolvimento da depressão a partir da inflamação.

Embora o processo inflamatório esteja associado com a depressão e alguns pacientes não respondam de forma eficiente aos tratamentos convencionais, que visam a regulação dos níveis de neurotransmissores (Morris *et al*, 2016), a via monoaminérgica ainda é frequentemente observada, uma vez que os níveis de neurotransmissores se encontram diminuídos e os fármacos disponíveis são eficazes em aumentar a concentração extracelular desses neurotransmissores, como a serotonina.

Compreender os mecanismos imunes envolvidos na depressão, principalmente relacionados à imunidade adaptativa celular e à serotonina, é de extrema importância, uma vez que várias desordens autoimunes e inflamatórias, como a esclerose múltipla, comprometem a qualidade de vida dos pacientes, e, na depressão, há níveis reduzidos de serotonina. Estratégias que tenham como foco a diminuição do processo inflamatório podem corroborar a melhora de transtornos de humor e, com isso, melhorar o prognóstico dos pacientes.

Serotonina

A serotonina (5-HT – 5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor característico do SNC e também um hormônio periférico, desempenhando diversas funções a nível central e periférico, como regulação do humor, apetite, sono, temperatura corporal, metabolismo, regulação da pressão sanguínea, sistema de coagulação, movimentos peristálticos e regulação imune (Dorszewska *et al*, 2013; Kato, 2013; Snir, 2013;). É uma indolamina produzida pelos neurônios e também por células intestinais, parede dos vasos sanguíneos e coração.

Sua maior produção (aproximadamente 95%) ocorre nas células enterocromafínicas (CE) do trato gastrointestinal (TGI), através da enzima triptofano hidroxilase (TPH)-1, e sua síntese ocorre também de forma independente no tecido periférico e nervoso (Khan & Chia, 2010; Gershon & Tack, 2007). A serotonina tem como precursor o L-triptofano, que é um aminoácido essencial encontrado em proteínas de origem animal ou vegetal (Khan & Chia, 2010). A primeira reação é a hidroxilação do triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP - 5-hydroxytryptophane) pela enzima TPH (Kato, 2013). Essa enzima é de extrema importância, pois limita a velocidade de síntese da serotonina. Existem duas isoformas da TPH: a TPH1 e a

TPH2. A TPH1 é encontrada nos órgãos periféricos, como o intestino e o baço, já a TPH2, no tronco cerebral (Khan & Chia, 2010). Após esse processo, a 5-HTP é descarboxilada a 5-hidroxitriptamina (5-HT), sendo posteriormente metabolizado pelo corpo (Dorszewska *et al*, 2013; Hamel, 2007).

Após sintetizada, a serotonina é liberada no sangue e armazenada e transportada pelas plaquetas (Berger *et al*, 2009), cuja entrada é facilitada pelo transportador de recaptação da 5-HT (5-HTT – 5-HT reuptake transporter, SERT) (Dorszewska *et al*, 2013), uma vez que é uma molécula polar e não passa facilmente pelas membranas plasmáticas. O SERT regula a magnitude e duração da resposta serotoninérgica, via reciclagem de serotonina lançada na fenda sináptica (Kim, 2012). Após a ativação plaquetária, seja pela inflamação ou pelo processo de formação de trombos, a serotonina é liberada (Duerschmied *et al*, 2009; Mössner *et al*, 1998), exercendo, assim, suas funções periféricas. O nível de 5-HT no sangue total é aproximadamente 65 a 250 ng/ml (Watts *et al*, 2012), e, no plasma, 72,6 a 79,8 ng/ml (Choi *et al*, 2021).

A serotonina, ao ser liberada, é capturada pelas células-alvo SERT⁺ onde fica armazenada dentro de vesículas (LAMP-1 – do inglês *Lysosomal-associated membrane protein 1*); posteriormente é liberada via exocitose Ca⁺⁺-dependente (O'CONNEL *et al.*, 2006) e, uma vez não utilizada, é degradada pela enzima monoamina oxidase A (MAO - do inglês *monoamine oxidase*) a ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) (Khan & Chia, 2010).

Para exercer suas funções biológicas, esse neurotransmissor precisa interagir com receptores presentes nas membranas das células e pela ligação covalente da serotonina a diferentes proteínas efetoras – processo chamado serotonilação (Berger *et al*, 2009; Walther *et al*, 2003). Esses receptores estão classificados em grupos conhecidos como 5-HT1 a 5-HT7, sendo que todos são receptores de membrana acoplados à proteína G, exceto o 5-HT3, que é um canal iônico (Kato, 2013). Tanto os receptores de serotonina quanto o seu transportador estão amplamente distribuídos por todo o SNC e periférico, estando envolvidos em processos somestésicos (emoção, cognição, memória, percepção da dor e funções gastrointestinais) e distribuídos nas células imunes, desempenhando papel na regulação da inflamação (El-Salhy *et al.*, 2012; Kim, 2012; Benton *et al.*, 2010).

Há uma complexa interação entre o sistema nervoso e imune, principalmente a nível de TGI (Wu *et al*, 2018; Kim, 2012). Estima-se que mais de 90% de todas as células do sistema imune estejam dispersas pelas mucosas, principalmente no TGI (Khan & Chia, 2010). Devido à localização estratégica, o sistema imune é capaz, portanto, de interagir com as células enterocromafínicas e consequentemente influenciar a síntese de serotonina (Li *et al.*,

2011). Citocinas produzidas pelas células T CD4⁺ (em especial pelos fenótipos Th1 ou Th2), ao interagirem com as células enterocromafínicas, amplificam a produção desse neurotransmissor (Khan & Ghia, 2010).

As células do sistema imune possuem de forma abrangente toda a maquinaria necessária para síntese, armazenamento e degradação desse neurotransmissor – a enzima TPH, o SERT e a MAO respectivamente, assim como possuem diferentes receptores capazes de interagir com a serotonina – das classes 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ e 5-HT₇ (Tabela 1) – e sofrer modulação por este neurotransmissor (Eddahibi *et al*, 2006; Mössner & Lesch, 1998; Finocchiaro *et al*, 1988; Jackson *et al*, 1988; Faraj *et al*, 1994). Sendo assim, a serotonina tem mostrado efeitos imunomoduladores, principalmente quando derivada de fontes periféricas. Roszman e colaboradores (1985) mostraram que os efeitos imunomoduladores são mediados por mecanismos periféricos dirigidos a células imunes circulantes.

Tabela 1 - Componentes serotoninérgicos nas células imunes

Tipo celular	Receptores de 5-HT	SERT	TPH	MAO
Monócitos e macrófagos	1A, 1E, 2A, 3A, 4,7	+	+	+
Microglia	2B, 5A, 7			
Células dendríticas	1B, 1E, 2A, 2B, 4, 7	+		+
Neutrófilos	(1A, 1B, 2)			
Basófilos				
Mastócitos	1A	+	+	
Eosinófilos	1A, 1B, 1E, 2A, 2B, 6			
Células B	1A, 2A, 3, 7	+		
Células T	1A, 1B, 2A, 2C, 3A, 7	+	+	+
Células NK				
Plaquetas	2A, 3	+		+
Células endoteliais	1B/D β , 2A, 2B,4	+	+	
Células do músculo liso vascular	1D, 2A, 2B, 7			

Componentes serotoninérgicos nas células imunes: receptores de 5-HT (serotonina), SERT – transportador de recaptação da serotonina, TPH (triptofano hidroxilase) e MAO (monoamina oxidase A). Fonte: Herr, N., Bode, C., Duerschmied, D., (2017). The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front. Cardiovasc. Med.* 4:48..

Estudo por Stefulj e colaboradores (2000) mostrou que os mRNA dos receptores 5-HT1B, 5-HT1F, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT6 e 5-HT7 estão expressos *ex vivo* em linfócitos isolados do sangue periférico, timo e baço. Essas células, quando estimuladas com mitógeno, expressam o mRNA para o subtipo de receptor 5-HT3. Os RNAs mensageiros dos receptores 5-HT1A, 5-HT1D, 5-HT2C, 5-HT4, 5-HT5A e 5-HT5B não foram detectados na população de linfócitos (Stefulj *et al.*, 2000).

Distúrbios nos níveis de 5-HT podem estar associados com a patogênese de inúmeras doenças neurológicas, como a esclerose múltipla e a depressão. Em pacientes com EM, níveis do triptofano estão reduzidos tanto no plasma como no líquido (Cocco *et al.*, 2016; Monaco *et al.*, 1979; Tagliamonte *et al.*, 1973). A baixa concentração do aminoácido triptofano no líquido e no plasma dos pacientes associa-se com a diminuição da síntese cerebral de 5-HT e a hiperativação da via quinurenina de metabolismo da serotonina, que leva a um grave desbalanço entre metabólitos protetores e neurotóxicos. Essa via compete com a de melatonina, que também tem como precursor o triptofano (Lovelace *et al.*, 2016; Anderson & Rodriguez, 2015; Talaei *et al.*, 2011), o que pode contribuir com a insuficiência da serotonina no organismo.

Embora os níveis de serotonina (5-HT) encontrem-se diminuídos no SNC, Markianos e Sfagos (1988) encontraram uma correlação negativa desses níveis com a incapacidade neurológica dos pacientes com EM-RR. A reduzida atividade serotoninérgica pode levar à perda axonal, intensificando assim uma consequência da doença. Estudo por Foley e colaboradores (2014) mostrou que o tratamento com a fluoxetina, um antidepressivo da classe dos inibidores seletivos da reuptake de serotonina (SSRI – do inglês *Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*) reduziu a formação de novas lesões na RM de pacientes com EM-RR, assim, diminuindo o risco de recaídas. Essa melhora clínica pode estar associada, em parte, ao fato de este antidepressivo favorecer o aumento da concentração da serotonina no espaço extracelular (Branco-De-Almeida *et al.*, 2011), possibilitando assim que haja um maior tempo de interação desse neurotransmissor com as células adjacentes. Estudos mostraram que a administração dessas drogas inibe a proliferação e a produção de citocinas pró-inflamatórias (Spiller & Lam, 2012; Gobin *et al.*, 2013), e também estimula a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória (Kubera *et al.*, 2012).

Estudos que avaliem a modulação da serotonina nas células imunes de pacientes com EM e depressão, principalmente as mais envolvidas na patogênese dessas doenças, estão faltando, mesmo sendo extremamente importante para a compreensão dos possíveis mecanismos inflamatórios. Nesse contexto, esses mecanismos podem ser modulados de forma negativa ou positiva, auxiliando no manejo desses pacientes e corroborando para o

desenvolvimento de estratégias terapêuticas, baseadas num tratamento multiprofissional. Sendo assim, o estudo do impacto da serotonina na resposta das células T em pacientes com EM e depressão vai ajudar a compreender fenômenos tão importantes para a homeostase do organismo.

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Determinar o perfil fenotípico e funcional das células T de pacientes com esclerose múltipla, apresentando ou não sintomas depressivos, e avaliar a capacidade da 5-HT em modular o status funcional dessas células.

1.2 Específicos

Artigo 1: Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4⁺ T cell subsets in multiple sclerosis patients

Priscila M. Sacramento, Clarice Monteiro, Aleida S. O. Dias, Taissa M. Kasahara, Thaís B. Ferreira, Joana Hygino, Ana Cristina Wing, Regis M. Andrade, Fernanda Rueda, Marisa C. Sales, Claudia Cristina Vasconcelos, and Cleonice A. M. Bento. *European Journal of Immunology* (2018) Aug;48(8), 1376-1388.

doi: 10.1002/eji.201847525.

- a) Analisar o impacto da 5-HT na resposta proliferativa e na produção de citocinas pelas células T ativadas policlonalmente em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com EM e indivíduos saudáveis.
- b) Avaliar a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ e TCD8⁺ purificadas em resposta a ativação policlonal na ausência e na presença de serotonina.
- c) Determinar o efeito da serotonina em modular a expressão de marcadores relacionados a ativação e função de células T efetoras e reguladoras.
- d) Correlacionar os dados referentes à caracterização fenotípica e funcional das células T de pacientes com o número de lesões cerebrais ativas.
- e) Avaliar a capacidade da serotonina em modular, diretamente, a função supressora das células T reguladoras em sistemas de co-culturas de células T efetoras e reguladoras.

Artigo 2: Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients

Priscila M. Sacramento, Marisa C. Sales, Taissa M. Kasahara, Clarice Monteiro, Hugo A. A. Oyamada, Aleida S. O. Dias, Lana Lopes, Camilla T. Castro, Átila D. Rossi, Lucas M. Milioni, Anshu Agrawal, Regina Alvarenga, Cláudia Cristina Vasconcelos, Cleonice A. M. Bento. (artigo submetido)

- a) Quantificar as citocinas no plasma de pacientes com EM, com e sem depressão;
- b) Correlacionar os níveis de citocinas plasmáticos com o grau de incapacidade neurológica e a gravidade da depressão nos pacientes;
- c) Avaliar a proliferação e a produção de citocinas pelas células T de pacientes com EM, com ou sem depressão, em resposta a mitógenos ou a proteína básica da mielina (PBM);
- d) Correlacionar a produção de citocinas produzidas pelas células T de pacientes ativadas com mitógeno e com PBM, com o grau de incapacidade neurológica e a gravidade da depressão nos pacientes;
- e) Determinar o impacto da depressão na frequência de diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ efectoras e reguladoras em resposta à ativação policlonal ou PBM;
- f) Analisar se a frequência de diferentes subtipos de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com EM se correlaciona com o grau de incapacidade neurológica e gravidade da depressão;
- g) Avaliar a capacidade da serotonina em regular a produção das citocinas pelas células T ativadas, de maneira policlonal ou específica, de pacientes com EM, sem e com depressão.

2. ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1 Artigo 1 – Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4⁺ T cell subsets in multiple sclerosis patients (Artigo Publicado)

1376 Priscila M. Sacramento et al. DOI: 10.1002/eji.201847525 Eur. J. Immunol. 2018. 48: 1376–1388

Basic

European Journal of
Immunology

Immunodeficiencies and autoimmunity

Research Article

Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4⁺ T-cell subsets in multiple sclerosis patients

Priscila M. Sacramento^{1,2}, Clarice Monteiro^{1,2}, Aleida S. O. Dias^{1,2}, Taissa M. Kasahara^{1,2}, Thaís B. Ferreira^{1,2}, Joana Hygino³, Ana Cristina Wing⁴, Regis M. Andrade⁵, Fernanda Rueda⁶, Marisa C. Sales², Claudia Cristina Vasconcelos⁴ and Cleonice A. M. Bento^{1,2,3} 

¹ Post-graduate Program in Microbiology, Department of General Medicine Department, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

² Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³ Post-graduate Program in Molecular and Cellular Biology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴ Post-graduate Program in Neurology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Department of General Medicine Department, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁶ Clinical of Diagnosis by Image, Barra da Tijuca Unity, Rio de Janeiro, Brazil

Excessive levels of proinflammatory cytokines in the CNS are associated with reduced serotonin (5-HT) synthesis, a neurotransmitter with diverse immune effects. In this study, we evaluated the ability of exogenous 5-HT to modulate the T-cell behavior of patients with MS, a demyelinating autoimmune disease mediated by Th1 and Th17 cytokines. Here, 5-HT attenuated, in vitro, T-cell proliferation and Th1 and Th17 cytokines production in cell cultures from MS patients. Additionally, 5-HT reduced IFN- γ and IL-17 release by CD8⁺ T cells. By contrast, 5-HT increased IL-10 production by CD4⁺ T cells from MS patients. A more accurate analysis of these IL-10-secreting CD4⁺ T cells revealed that 5-HT favors the expansion of FoxP3⁺CD39⁺ regulatory T cells (Tregs) and type 1 regulatory T cells. Notably, this neurotransmitter also elevated the frequency of Treg17 cells, a novel regulatory T-cell subset. The effect of 5-HT in upregulating CD39⁺ Treg and Treg17 cells was inversely correlated with the number of active brain lesions. Finally, in addition to directly reducing cytokine production by purified Th1 and Th17 cells, 5-HT enhanced in vitro Treg function. In summary, our data suggest that serotonin may play a protective role in the pathogenesis of MS.

Keywords: Multiple sclerosis · Serotonin · Th1/Th17 axis · Treg subsets



Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Introduction

MS is a chronic and debilitating condition affecting the CNS due to immune attack against the myelin sheath. Most patients (>80%)

have a recurrent form of the disease, named relapsing remitting MS (RRMS), characterized by repeated attacks of neurological disabilities [1]. Besides MS being characterized by increased physical disability over 30–40 years [1], some symptoms, such as fatigue and cognitive impairment, are also commonly associated

Correspondence: Dr. Cleonice A. M. Bento
e-mail: cbento@globob.com

with depression [2–4]. Although the rate of major depressive disorder (MDD) is high in MS patients, some psychiatric symptoms associated with MDD may also be linked to advanced neurodegeneration [5]. Nevertheless, in patients with the relapsing remitting form, depression might be linked to elevated levels of proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α , which deregulates the production of some neurotransmitters, such as serotonin [6–9].

Serotonin, or 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a CNS neurotransmitter, which plays an important role in the regulation of mood, appetite, sleep, body temperature, and metabolism [10]. It is also found in the gastrointestinal tract and enteric neurons, where it mediates the control of local physiological functions, such as peristaltic reflexes [11–13]. In the immune system, serotonin, through different 5-HT receptor (5-HTR) subsets, modulates different functional profiles of mononuclear cells in a dose-dependent manner [14, 15]. Furthermore, dendritic cells, by expressing the serotonin transporter, store this neurotransmitter into vesicles [16], which may modulate the behavior of T lymphocytes, the main cells implicated in MS pathogenesis.

Much evidence suggests that both myelin-specific Th1 and Th17 cells orchestrate brain and spinal cord lesions in RRMS [17]. High IL-17 levels have been detected not only in peripheral blood and CSF of patients with RRMS during clinical relapses [18, 19], but also in astrocytes and oligodendrocytes in active brain lesion areas [18, 20]. Additionally, cytotoxic CD8⁺ T cells that produce IFN- γ (Tc-1) or IL-17 (Tc-17) also contribute to brain lesions [21–23]. Moreover, IL-22, produced by Th17 and Th22 cells, has been associated with direct apoptosis of oligodendrocytes [24, 25], a high number of active brain lesions and a risk of further relapses [24–26]. The relationship between Th17 and MS exacerbation should also be related to the ability of IL-21 to damage the functional status of regulatory CD25^{high}FoxP3⁺CD4⁺ T cells [27–34], an important Treg subset implicated in the maintenance of self-tolerance [35]. Finally, excessive cytokine production by Th1/Tc-1 and Th17/Tc-17 axis may also contribute to MS pathogenesis by depleting tryptophan, an essential amino acid for the synthesis of serotonin (5-HT), known as an important CNS neurotransmitter [36]. Taking into consideration that human T cells express receptors for serotonin, the present study aimed to evaluate the effect of this neurotransmitter on in vitro T-cell behavior in MS patients.

Results

Serotonin modulates the in vitro T-cell proliferation and cytokines production in RRMS patients

Our study was performed with 35 young adult MS patients (31.1 $\pm$ 8.2), 10 men (29%), and 25 women (71%), all in remission phase (Table 1). Mean time between MS diagnosis and blood sampling was approximately 6.1 years (range 2–10 years). All patients were naive for disease modifying therapies (DMT), and 60% of them had been previously treated with oral or intravenous

Table 1. Demographic and clinical features of the MS patients and controls

	Control ^a	MS ^b
N ^o of subjects (n)	20	35
Gender, women/men (n)	15/05	25/10
Age in years (mean $\pm$ SD)	29.1 $\pm$ 7.3	31.1 $\pm$ 8.2
Disease duration in years [mean (range)]	NA ^e	6.1 (2–10)
N ^o of active brain lesions [mean (range)] ^d	NA	4.3 (0–25)
EDSS [mean (range)] ^c	NA ^e	2 (0–5)

Data from ^ahealthy individuals and ^brelapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) in remission phase. Age (years) refers to age when blood samples were collected. Disease duration refers to the years since the definitive MS diagnosis. ^cEDSS, expanded disability status scale. ^dThe number of active brain lesions by MRI scan were determined at the time when blood was collected to perform the immune assays. ^eNot applicable.

corticosteroids to control the acute neurological bouts. However, at the time of the study, none of these patients had received corticosteroids for 60 days. The great majority of MS patients (30/35) had no or minimal neurological disability (expanded disability status scale [EDSS] ranged 0–2). Despite all patients being clinically asymptomatic, at the moment of evaluation, the data from the brain magnetic resonance imaging (MRI) scan revealed that 21 patients (60%) had active brain lesions (ranging from 2 to 25) (Table 1).

The first immune assay studied was the T-cell proliferation and cytokine production following activation of PBMC cultures with PHA. As demonstrated in Fig. 1A, although T cells from MS patients tend to proliferate less when compared with cell cultures from the control group ($p = 0.0501$), 5-HT reduced both thymidine uptake (Fig. 1A) and IFN- γ production (Fig. 1B) in cell cultures from both experimental groups. Concerning the cytokines related to Th17 responses, significantly higher levels of IL-22, IL-6, and IL-17 were observed in the cell cultures from MS patients, and 5-HT reduced the production of these cytokines. Additionally, TNF- α release was inhibited by 5-HT, with no difference between control and MS cell cultures (Fig. 1B). Notably, the ability of 5-HT to diminish cell proliferation and proinflammatory cytokine release was not due to lower cell viability (Supporting Information Fig. 1). By contrast, this neurotransmitter upregulated IL-10 production (Fig. 1B). Among MS patients, we did not observe any relationship between the ability of serotonin to modulate T cell-derived cytokine production and the EDSS score or the number of active brain lesions (data not shown).

Serotonin variably modulates the production of cytokines by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from RRMS patients

In order to analyze the direct effect of 5-HT on cytokine production by T cells from RRMS patients, enriched CD4⁺ and CD8⁺

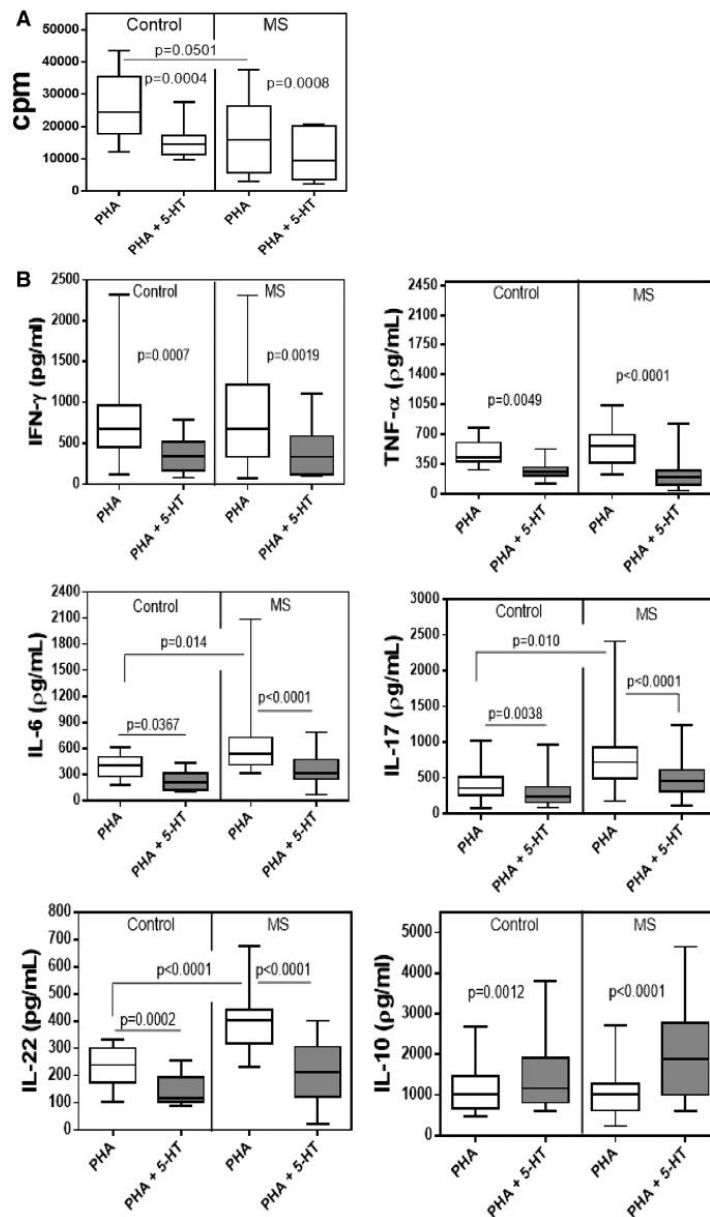


Figure 1. The effect of serotonin (5-HT) on in vitro T cell proliferation and cytokine production from MS patients. PBMC cultures from healthy subjects (control, $n = 20$) and MS patients ($n = 20$) were stimulated with PHA, with or without 5-HT, for 3 days. The cell proliferation (A) and cytokine contents (B) in the supernatants were determined by [3 H] thymidine uptake and ELISA, respectively. In the figure, the horizontal bars within boxes correspond to the median; box limits correspond to 25th and 75th percentiles and vertical lines indicate the range. Cell proliferation and cytokine production were investigated in 14 independent experiments with five donors each (total 20 healthy and 30 MS donors). The mean values of control and MS groups were compared using two-way ANOVA and the p values are indicated in the figure.

T-cell cultures, obtained via negative selection, were activated with anti-CD3/anti-CD28 beads in the absence or presence of serotonin. In this system, the levels of IL-17 (598 ± 277 pg/mL $\times 371 \pm 165$ pg/mL, $p = 0.0233$), IL-6 (432.1 ± 207.6 pg/mL $\times 166.6 \pm 66.3$ pg/mL, $p = 0.0012$), and IL-22 (367 ± 211.2 $\times 77.5 \pm 45.8$ pg/mL, $p < 0.0001$) released by CD4 $^+$ T cells

were significantly higher than those from CD8 $^+$ T cells (Fig. 2). By contrast, CD8 $^+$ T cells produced more IFN- γ than CD4 $^+$ T cells. 5-HT reduced all T cell-derived proinflammatory cytokines, except for IL-22 by CD8 $^+$ T cells, which was secreted at low levels (Fig. 2). The highest IL-10 dosage was detected in the supernatants from CD4 $^+$ T cells (607 ± 187.3 pg/mL $\times 167.1 \pm 101.8$

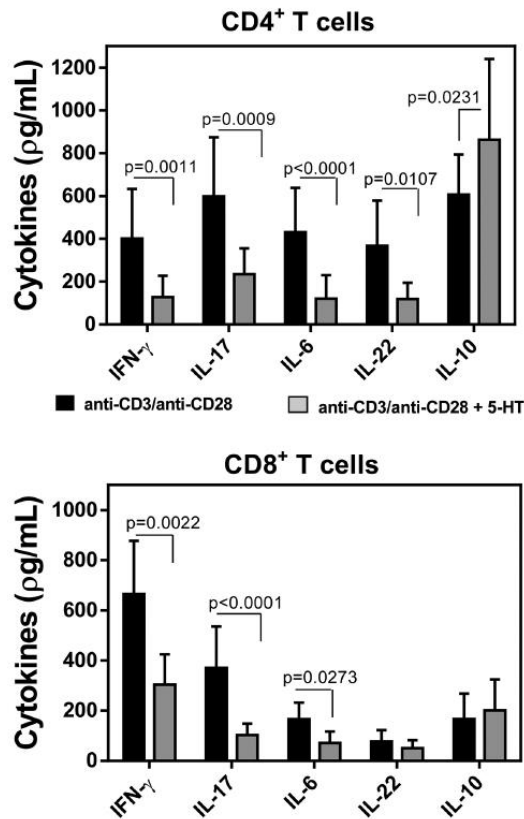


Figure 2. The ability of serotonin (5-HT) to modulate cytokine production by purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells from MS patients. CD4⁺ and CD8⁺ T cells, obtained from MS patients ($n = 15$), were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 immunomagnetic beads in the presence or absence of serotonin (5-HT, 200 ng/mL). After 3 days, cytokine concentrations were determined by ELISA. In the figure, the cytokine levels are presented as mean $\pm$ SD. Data are pooled from four independent experiments with four donors each (total 12 donors). The mean values of the control and MS groups were compared by using Student's *t* test and the *p* values are indicated in the figure.

pg/mL), and its levels were elevated after the addition of 5-HT (Fig. 2A).

Serotonin elevates IL-10 production by different regulatory CD4⁺ T-cell subsets

MS pathogenesis has been associated with damage to Treg compartments. A lower frequency of both FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ T cells (Tregs) and FoxP3⁺IL-10⁺ T (Tr-1) cell subsets have been observed in unstable MS patients [29, 30, 32–34]. Here, 5-HT enhanced IL-10 production by whole activated CD4⁺ T cells from patients (Fig. 2A). Here, taking into consideration the gating strategy shown in Fig. 3A for identification of CD4⁺ T cells able to express FoxP3 and IL-10, 5-HT elevated the percent-

Table 2. Correlation coefficient (*r*) between the proportions of different cytokine-secreting CD4⁺ T cells modulated in vitro by serotonin and the active brain lesions in MS patients

	N ^o active brain lesions	
% CD4 ⁺ T cells	<i>r</i>	<i>p</i>
% IFN- γ ⁺ IL-10 ⁻	0.3951	0.2795
% IL-17 ⁺ IL-10 ⁻	0.3763	0.2981
% IL-17 ⁺ IL-10 ⁺	-0.5439	0.0259
% FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺	0.1342	0.7118
% FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺	0.4286	0.1162
% FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺ CD39 ⁺	-0.7099	0.0010

The proportion of different activated (anti-CD/anti-CD28 beads) cytokine-secreting CD4⁺ T-cell subsets maintained in the presence of 5-HT (200 ng/mL) was correlated with radiological activity of the disease in MS patients ($n = 30$). The Pearson's correlation was applied and the *p* values are indicated at the figure.

age of IL-10-secreting CD4⁺ T cells coexpressing or not the protein FoxP3 in PBMC cultures activated by anti-CD3/anti-CD28 beads in both experimental groups (Fig. 3B). Additionally, as can be observed in the representative histograms showing identification of IL-10⁺FoxP3⁺CD4⁺ T cells positives for CD25, CD152, or CD39 (Fig. 3C), this neurotransmitter increased the proportion of FoxP3⁺IL-10⁺CD4⁺ T cells expressing CD39 (Fig. 3D), a functional marker of Treg [37]. On the other hand, 5-HT did not alter the frequency of FoxP3⁺IL-10⁺CD4⁺ T cells positive for CD25 or CD152 in either the control group or MS patients (Fig. 3D). Moreover, this neurotransmitter did not change the proportion of CD25⁺FoxP3⁺CD4⁺ T cells coexpressing, or not, CLTA-4 (data not shown). As expected, in activated PBMC cultures, 5-HT reduced the percentage of Th1- and Th17-like phenotypes, identified by the expression of IFN- γ or IL-17 associated with the absence of IL-10 (Fig. 3E–G). On the other hand, serotonin upregulated the proportion of nonclassical regulatory Th17 cells, named Treg17, identified by the coexpression of IL17 and IL-10 in both experimental groups (Fig. 3G). Finally, and more significantly, although no difference was observed with regard to the percentage of different Treg cell subsets between MS patients, the ability of serotonin to modulate the percentage of CD39⁺Tregs and Treg17 cells was inversely correlated with the radiological activity of the disease (Table 2).

Serotonin modulates in vitro the cytokine production by Th1 and Th17 cells and elevates Treg function

Previous findings demonstrated the ability of 5-HT to upregulate the expression of regulatory markers (IL-10 and CD39) and reduce IL-17 and IFN- γ production by CD4⁺ T cells from MS patients in polyclonally activated PBMC cultures. As demonstrated in the Fig. 4A, this neurotransmitter was also able to directly reduce the release of both IL-17 and IL-22 or IFN- γ by enriched Th17 and Th1 cell cultures, respectively. As expected, IFN- γ production by Th17 cells was low and it was reduced by 5-HT (Fig. 4A). In addition, 5-HT not only elevated significantly the IL-10 produced by Th17

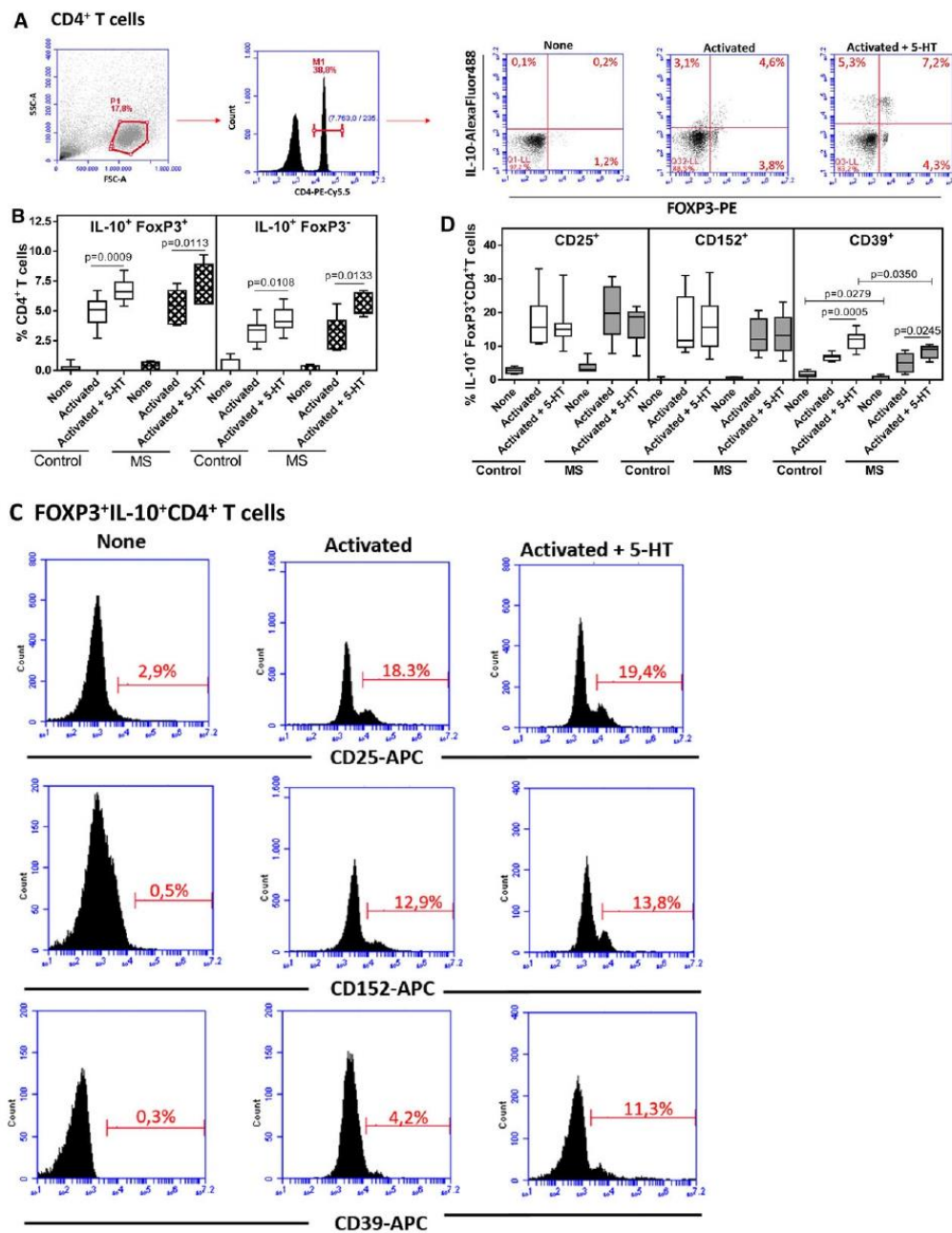


Figure 3. Serotonin (5-HT) favors the expansion of different Treg subsets in cell cultures from MS patients. PBMCs from healthy and MS subjects were stimulated for 3 days with beads coated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies followed by rapid activation with PMA and ionomycin in the presence of brefeldin A. In some wells 5-hydroxytryptanamide (5-HT) was added at the beginning of the incubation period. Indicated cell subsets were analyzed by flow cytometry. In (A and B), the cell frequency of IL-10⁺ CD4⁺ T cells expressing or not FoxP3 was determined; In (C and D), the percentage of IL-10⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T cells that express CD25, CD152, or CD39; and in (F) and (G), the proportion of IL-10⁺ CD4⁺ T cells able to express IFN- γ or IL-17 cytokines, respectively. The frequency of Treg cell subsets was investigated in 14 independent experiments with five donors each (total 20 healthy and 30 MS donors). The mean cytokine values are compared using two-way ANOVA and the p values are indicated in the figure.

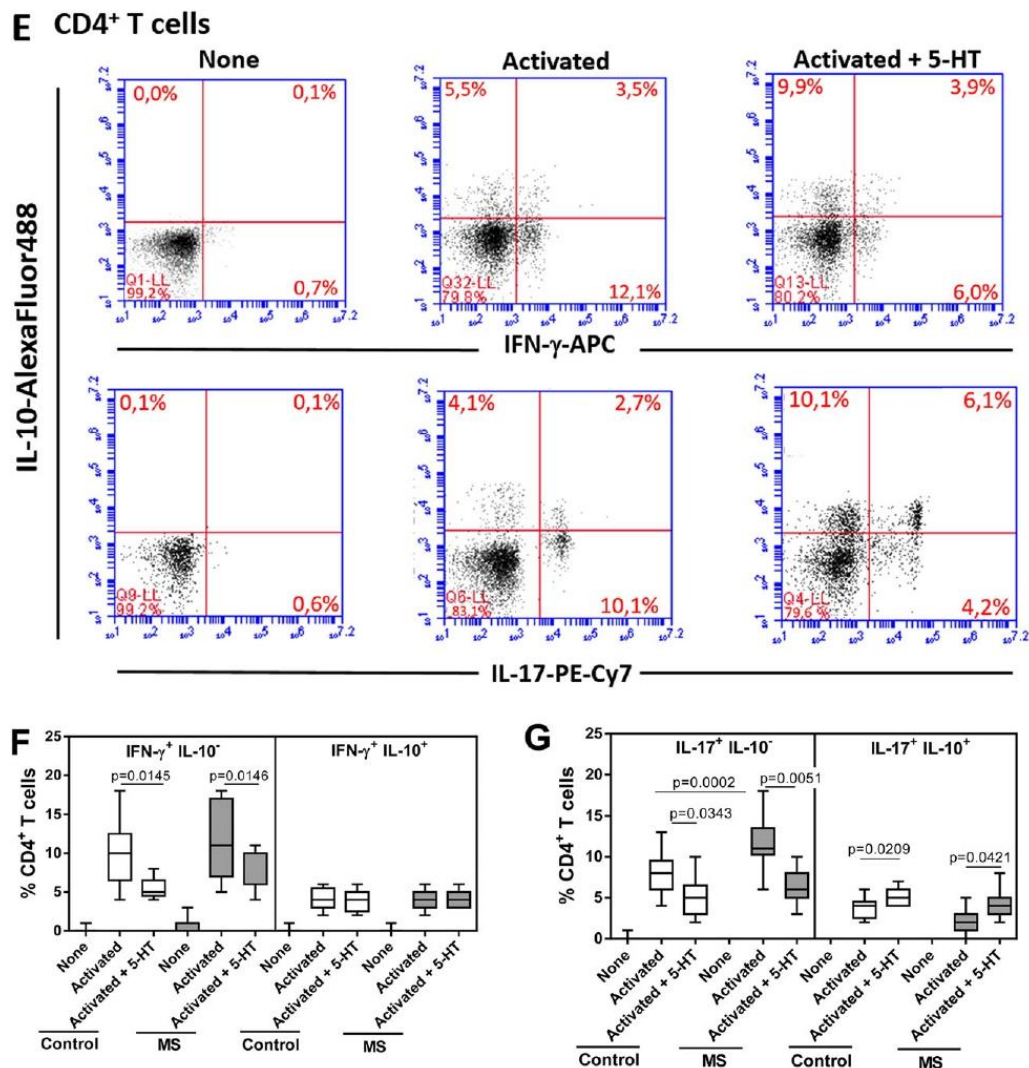


Figure 3. Continued.

and Treg cultures (Fig. 4A), but also enhanced the ability of Tregs to inhibit Tresp proliferation (Fig. 4B).

Discussion

A high incidence of depression-related symptoms has been observed in MS patients, a T-cell mediated demyelinating autoimmune disease of the CNS. Excessive production of proinflammatory cytokines during depression and MS, related to a reduction of both synthesis and availability of serotonin in the CNS, may

contribute to the severity of the disease. Indeed, serotonergic neurotransmission is altered in the brain of MS patients [38]. In the present study, serotonin attenuated, in vitro, the production of cytokines by effector T cells, while favoring the expansion of classical and nonclassical Treg subsets in MS patients. To our knowledge, this is the first report that demonstrates these events in MS patients.

MS studies using animal models, called EAE, as well as findings from humans, have suggested a pivotal role of myelin-specific Th17 cells in the disease. Some cytokines, such as IL-17 and IL-22, produced by pathogenic Th17 cells, play a deleterious role in MS,

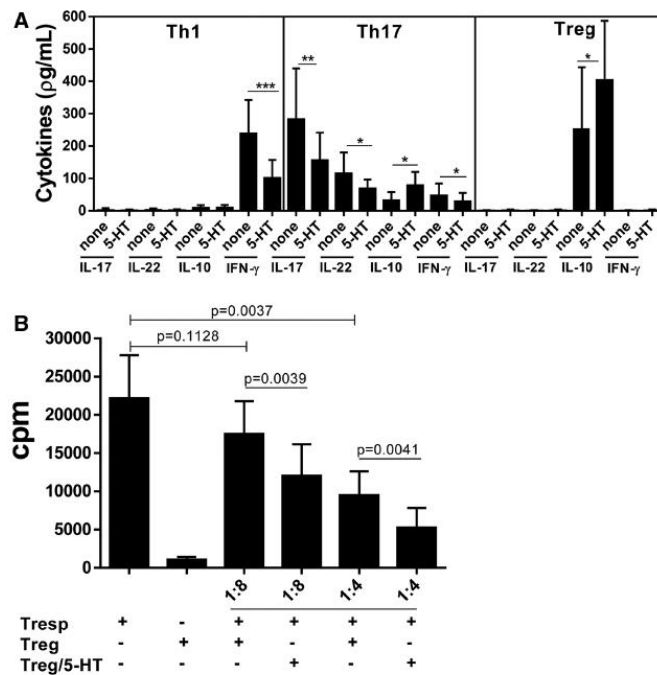


Figure 4. 5-HT directly modulates in vitro cytokine production by MS-derived Th1, Th17, and Treg cells and increases Treg function. In (A), enriched Th1, Th17, and Treg cultures, obtained from MS patients, were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 beads in the absence or presence of serotonin. After 3 days, the cytokine levels were determined by ELISA. The mean cytokine values in the presence or absence of 5-HT were compared using Student's *t* test and (**), (*), and (°) indicate $p < 0.0001$, $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively. In (B), activated 2.5×10^4 Tregs, previously maintained with medium alone or 5-HT, were cocultured with Tresp at 1:8 and 1:4 Treg/Tresp ratio. After 3 d, the cell proliferation was determined through [3 H] thymidine up take. In (B), the mean values of cpm were compared using Student's *t* test and the *p* values are indicated in the figure. The effect of 5-HT on either cytokines-producing Th1, Th17, and Treg cells and on Treg function was investigated in four independent experiments with four donors each (total 12 donors).

inducing local (microglia) and migrant (macrophages and dendritic cells) accessory cells to produce high levels of free radicals derived from oxygen and metalloproteinase 9, all of them implicated in the neuronal demyelination process [17]. In the present study, in agreement with other authors [17–20, 25], higher IL-22 and IL-17 levels were released by MS-derived T cells. Moreover, the percentage of IL-17-secreting CD4⁺ T cells was also elevated among patients. The addition of 5-HT not only reduced T-cell proliferation but also the production of cytokines related to Th1 and Th17 phenotypes in cell cultures from both experimental groups. These effects of 5-HT were also observed when added to purified Th1 and Th17 cells from MS patients. With regard to clinical parameters, no relationship between in vitro immune effects of 5-HT on effector T cells with EDSS scores was observed, which could be explained by an absence of or minimal neurological impairments among our MS patients.

The effect of serotonin on immune cells depends on the 5-HT receptor subtype. Muller et al. [39] demonstrated that this neurotransmitter, through 5-HT₄ and 5-HT₇ receptors, increases the production of IL-6 and IL-10 by mononuclear cells from healthy subjects. Furthermore, in this system, 5-HT₄ receptor agonists decreased IFN- γ production [39]. In addition, signaling via 5-HT₄ receptors accelerates the release of acetylcholine from cholinergic myenteric neurons, which significantly reduces IL-6, IL-1 β , and TNF- α production by LPS-activated monocytes via 7 nicotinic receptors (7nAChR) [40]. Snir et al. [10] showed that the production of TNF- α by mononuclear cells after LPS stimula-

tion was inhibited by the 5-HT_{2A} receptor agonist. On the other hand, 5-HT_{3R} agonists appear to activate T cells [41]. This effect can be associated with the ability of this receptor to act as an inotropic ligand-gated ion channel, which is different from other serotonin receptors whose action is mediated via G-proteins [42]. In EAE, a study by Aminian et al. [43] demonstrated that selective 5-HT₃ receptor antagonists attenuated disease, and this protective effect was associated with both lower demyelination of the spinal cord and reduced in vitro IL-6 and IL-17 production by MOG-specific CD4⁺ T cells. By contrast, a recent study published by Chabbi-Achengli et al. [44], using an experimental rheumatoid arthritis model, demonstrated the ability of serotonin, via the 5-HT_{2A} receptor, to reduce the severity of collagen-induced arthritis in mice. In these animals, serotonin, as well as 5-HT_{2A} receptor agonists, diminished the frequency of type II collagen-specific-Th17 cells. Therefore, immunomodulatory proprieties of this neurotransmitter may be associated with differentiated expression of these receptor subtypes in immune cells. Although we intended to investigate the 5-HT receptor pattern using T cells from the MS patients, the findings in the present study suggest a beneficial effect of serotonin on one hand and the adverse consequences of chronic stress in MS on the other.

Mood disorders in MS patients have been widely associated with an elevated risk of clinical relapse [45]. Interestingly, treatment for depression with SSRIs was associated with a reduction of disease activity [46]. In EAE, SSRIs attenuated the severity of the disease, and it was associated with reduced T-cell proliferation

and proinflammatory cytokine production [47]. A study by Gobin et al. [48] demonstrated that fluoxetine, a classical SSRI, has an inhibitory effect on the in vitro mitogen-induced T-cell proliferation from healthy subjects. With regard to cytokines, SSRIs inhibit, in a dose-dependent manner, the in vitro production of proinflammatory cytokines by human lymphocytes and monocytes [49–51]. Moreover, SSRI diminishes excessive production of TNF- α and nitric oxide by microglia activated with LPS [52]. In an animal model for contact hypersensitivity induced by application of hapten 2,4-dinitrofluorobenzene, the beneficial effects of fluoxetine and desipramine in attenuating skin lesions were associated with a reduction of IFN- γ and IL-6 and an increase of IL-10 production by T cells [53]. Although some of these immunoregulatory properties of SSRI are serotonin-independent, its ability to elevate the availability of this neurotransmitter should also count for the benefits of using these anti-depressive drugs in patients suffering from inflammatory disorders. To avoid confounding factors related to advanced neurodegeneration and occurrence of MDD comorbidity, in the present study we evaluated the in vitro effect of 5-HT on T-cell cytokines from MS patients during the remission phase and low disability levels. However, currently, we are focusing on evaluating the behavior of T cells obtained from depressed MS patients before and after SSRI treatment. In this system, we will also determine the contribution of endogenous 5-HT to the cytokine-secreting T cells from those patients.

Like other autoimmune diseases, functional deficiencies of CD4⁺CD25^{high} FoxP3⁺ Tregs and Tr1 cells (IL-10⁺FoxP3⁻) have been described in MS patients during clinical relapses [54–57]. In addition to producing anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, the high expression of CD25 by Tregs may reduce effector T-cell action by taking up exogenous IL-2 [58]. Moreover, CD152, also expressed on Treg, may help to control inflammation by competitive antagonism of CD28:B7-mediated costimulation of effector T cells [59]. Here, only MS-derived CD4⁺ T cells elevate IL-10 in response to 5-HT, and this may be associated with differential 5-HT receptor subtypes expressed on CD4⁺ T cells. Moreover, this neurotransmitter not only increased the proportion of IL-10⁺CD4⁺ T cells expressing (Tregs) or not FoxP3 (Tr-1), but also upregulated the ability of Tregs to reduce responder CD4⁺ T-cell proliferation, which shows the ability of this neurotransmitter to enhance regulatory T function. In addition, 5-HT elevated the frequency of FoxP3⁺IL-10⁺CD4⁺ T cells expressing CD39. This result is very interesting, since CD39 has been associated with functional capacity of Tregs [60]. Functionally, CD39 degrades the extracellular adenosine triphosphate molecule in adenosine monophosphate, considered one of the mechanisms by which Tregs reduce inflammation [60]. Corroborating our findings, another study observed, a lower frequency of circulating CD39⁺ Treg patients among MS patients than in healthy subjects [37]. Moreover, reduced plasma 5-HT levels in subjects suffering from major depression disorders was associated with a decreased proportion of circulating CD39⁺ Tregs subset expressing 5-HT1A [61]. These results suggested that an imbalance in CD39⁺ Tregs may contribute to elevated

inflammatory status in those patients. Finally, 5-HT elevated the percentage of Treg17 phenotype, mainly among those with lower radiological activity of the disease. This new subtype of Th17 cells is capable of producing IL-10, and then controlling inflammatory responses [62–65]. In murine model of arthritis, deficiencies in the rate-limiting enzyme responsible for 5-HT synthesis, the TPH-1 (tryptophan hydroxylase 1), was associated with lower frequency of FoxP3⁺CD225^{high}CD4⁺ T cells in draining lymph nodes and severe articular lesions [44]. The ability of 5-HT to promote the expansion of different subtypes of regulatory CD4⁺ T cells reveals another mechanism by which this neurotransmitter can be a helpful adjuvant treatment for MS patients, principally in depressed patients.

Kim et al. [66] demonstrated that individuals with serious depression have a lower frequency of circulating classical Treg cells. Additionally, when compared with healthy individuals, their Treg cells expressed lower 5-HT1A receptor levels [66]. It is possible that functional damage of the Treg compartment in depression is linked to both excessive production of proinflammatory cytokines [67] and low 5-HT availability. Corroborating this, treatment with SSRIs reduces IFN- γ and increases IL-10 production of IL-10 by T cells [53].

Although it was not the focus of the present study, one possibility is that the immunoregulatory properties of 5-HT are also mediated by the endogenous production of melatonin. The synthesis of this hormone is dependent on serotonin availability, and activated T cells synthesize melatonin [68]. Melatonin has a potent antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective action [69–73], and lower levels of this hormone have been documented in MS patients [74, 75]. In EAE, exogenous melatonin reduced the severity of disease [76, 77]. In MS patients, a study by Alvarez-Sanchez et al. [78] demonstrated the capacity of melatonin to reduce the proportion of Th1 and Th22 cells, but to elevate IL-10 synthesis by PHA-activated T cells from MS patients as well. Due to the critical dependence on serotonin availability, the synthesis of melatonin is also compromised in depressed patients [79].

Finally, the reduction of inflammation may also indirectly contribute to neuroprotection in the context of MS, since high proinflammatory cytokine levels not only deplete tryptophan, an important amino acid for serotonin synthesis, but also promote the generation of neurotoxins, such as the glutamate agonist quinolinic acid, which contributes to the apoptosis of oligodendrocytes and neurons [80].

Although preliminary, our data suggests a possible protective effect of serotonin in the context of MS by modulating cytokine production implicated in the disease's severity.

Material and methods

Patients

Thirty-five patients with a definite RRMS diagnosis according to the McDonald criteria (2010) [81], during the clinical remission

phase, were recruited from Lagoa Federal Hospital and Gaffrée Guinle University Hospital/UNIRIO (Rio de Janeiro, Brazil). Demographic data such as gender and age at disease onset were obtained from medical records (Table 1). All patients were naïve for DMT and had not been submitted to corticoid therapy for at least 2 months. To avoid some variables that could confound our immune analyses, we excluded patients with depression, evaluated using the Beck Depression Inventory, or significant neurological impairments, which indicate advanced neurodegeneration. Participants presenting infectious or other autoimmune diseases were also excluded by clinical and serological tests. The neurological disability status of the patients was evaluated by authors (C.C.V. and A.C.W.) according to the EDSS [82], which was performed together with the blood sampling that occurred between 2 and 5 pm. To quantify the number of active brain lesions, patients underwent brain MRI at the time of blood sampling and clinical evaluation. Images were performed in Siemens Trio 3 Tesla machine. The sequences obtained were T1 GRE 3D (ECHO gradient) on the sagittal plane, with multiplanar reformatting before and after intravenous contrast, weighted sequences in T2 and proton density, FLAIR sequence and T1 magnetization transfer and dissemination with ADC map on the axial plane. Images were analyzed by a single neuroradiologist (F.R.), a specialist in demyelinating diseases and blind to the degree of the patient's disability. The information about the occurrence of clinical relapses since the diagnosis for MS was obtained from medical records. As a control group, 20 healthy subjects matched by age, gender, and ethnic background were recruited. In order to avoid interference from the circadian rhythm, the blood samples from control individuals were also collected during the same time period (2–5 p.m.). Significantly, no subject was taking antidepressant drugs at the time of blood sampling. The study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects at the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO) and blood was collected only after written informed consent was obtained from each individual.

Cell cultures

PBMC were obtained from cell centrifugation on Ficoll-Paque gradient. Viable PBMC were quantified by trypan blue exclusion and suspended in RPMI-1640 medium supplemented with 2 μ M of L-glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% of fetal calf serum, 20 U/mL of penicillin, 20 μ g/mL of streptomycin and 20 mM of HEPES buffer. Approximately 1×10^6 PBMC/mL were cultured in 96-well plates with 200 μ L of complete medium in the presence or absence of PHA (1 μ g/mL) or anti-CD3/anti-CD28 beads (10 μ L/mL) for 3 days, which corresponds to the period of maximal T-cell activation by polyclonal stimuli. For some experiments, purified CD4⁺ and CD8⁺ T cells were obtained via negative selection using magnetic columns according to manufacturer's instructions (EasySep™, StemCell Technology, Canada). Briefly, 50 μ L of the isolation cocktail were added to a cell suspension of 1×10^7 cells in 1 mL of HBSS in a 15 mL tube. After 10 minutes incu-

bation at room temperature, a volume of 100 μ L for CD4⁺ and 150 μ L for CD8⁺ of the RapidSpheres suspensions, respectively, were added to the cell suspension, followed by another incubation at room temperature for 5 minutes. Subsequently, 4 mL of HBSS were added to the cell suspension and the tube was then placed on a magnet for 5 minutes. Finally, the supernatants were recovered. The purity of CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells was >98%, as measured by flow cytometry (data not shown). In another set of experiments, following manufacturer's instructions, MS-derived PBMC cultures were enriched from CD4⁺CD127^{low}CD25⁺ Tregs, CD4⁺CD25⁺ responder T cells (Tresp), Th17 (CXCR6⁺CXCR3[−]), and Th1 (CXCR3⁺) cells by using EasySep™ kits (EasySep™, StemCell Technology, Canada). As determined by cytometry, the purity of Tregs, Tresp, Th17, and Th1 cells was >89.7%, >93.4%, >96.7%, and >96.8%, respectively (data not shown). All cell cultures were stored for 3 days in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads (10 μ L/mL). The effect of serotonin on the maximal response of different T-cell subsets to polyclonal activators was evaluated after adding 200 ng/mL of 5-HT at the beginning of the incubation period. We evaluated the effects of 5-HT on immune events at the T-cell peak response to mitogens (3 d). The serotonin concentration used here was based on the study performed by Soga et al. [83], who evaluated the effect of physiological brain concentrations of serotonin on immune function. All cell cultures were kept at 37°C and 5% CO₂.

Cell proliferation

Cell proliferation was measured by [³H] thymidine incorporation, added to cultures at 1 μ Ci/well 8 h before the end of the incubation time. The cells were harvested in glass fiber filters in an automatic cell harvester and radioactive incorporation was measured using a liquid-scintillation counter.

Suppression assay

In order to evaluate the ability of 5-HT to modulate the suppressive function of Tregs, CD4⁺CD25⁺CD127^{neg/low} T cells (1×10^5 /mL) from MS patients were maintained for 3 days in the presence of medium alone or 5-HT (200 ng/mL). At the end of incubation time (3d), the cells were washed with medium (RPMI at 5% CFS), to remove residual 5-HT, and then cocultured with autologous CD4⁺CD25[−]CD127⁺ Tresp at 1:8 and 1:4 Treg/Tresp ratios. Cocultures were set up in triplicate, incubated for 2 d at 37°C, and cell proliferation evaluated through [³H] thymidine uptake.

Immunofluorescence labeling and flow cytometry

At the end of cell culturing with anti-CD3/anti-CD28 beads, and to optimize intracellular cytokine detection, an additional short-term

activation of PBMC was conducted with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 20 ng/mL) plus ionomycin (600 ng/mL) in the presence of brefeldin A (10 µg/mL) for 4 h. For the fluorescence labeling, mouse anti-human fluorescent mAbs directed against CD4-FITC/PE-Cy5.5/APC, FoxP3-PE, CD25-APC, CD39-APC, CD152-APC, IL-17-PECy7, IL-10-AlexaFluor 488, IFN-γ-APC, and all isotype-control antibodies were purchased from BD Bioscience (San Diego, CA, USA), and were used to quantify the percentage of different T-cell subsets. Briefly, various mAbs combinations directed toward surface markers were added to the PBMC (2×10^5 /tube) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. The cells were washed with PBS and then permeabilized with Cytotfix/Cytoperm (BD Pharmingen, San Diego, CA) at 4°C for 20 min. After washing, the antibodies for intracellular staining (anti-IL-17, anti-IFN-γ, anti-IL-10, anti-FoxP3), or the corresponding anti-IgG1 isotype control, were added in various combinations and incubated for 30 min at 4°C. The cells were analyzed in the Accuri C6 (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA) and CFlow software (Accuri™, Ann Arbor, MI, USA). Isotype control antibodies and single-stained samples were periodically used to check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 100 000–200 000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, by using PI, and doublets. In some experiments, the analysis of T-cell viability was determined using 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (R&D systems). Additionally, the gated cells were negative for CD14 marker.

ELISA technique

After 3 days, the supernatant from different T-cell cultures was collected and the cytokines were quantified by ELISA technique using OptEIA ELISA kits (BD, Pharmingen, San Diego, CA), according to manufacturer's instructions. Each ELISA was performed using pairs of antibodies against IFN-γ, IL-6, TNF-α, IL-17, IL-21, IL-22, and IL-10. The reaction was revealed with streptavidin-HRP, using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as a substrate. Recombinant human cytokines, at concentrations ranging from 3.5–500 pg/mL, were used to construct standard curves.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism 5.0 software (GraphPad Software). All immunological evaluations were done in triplicate or quadruplicate for each individual and the intraassay variability ranged from 8.1 to 14.2% (median value of 10.8%) as calculated by the software. Comparisons between immune assays in the cell cultures from the control group and MS patients were made using two-way ANOVA. Within each experimental group, Wilcoxon test and the Student's *t* test were applied to determine the impact of 5-HT. Correlations between variables were sought using Pearson's correlation. The significance in all experiments was defined as $p < 0.05$.

Acknowledgments: This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho [Grant number: 26/201.208/2014] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [Grant number: 302714/2013-8].

Conflict of interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

References

- Rudick, R., Cohen, J., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R. and Ransohoff, R., Management of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 1997. 337: 1604–1611.
- Benito-León, J., Morales, J. M., Rivera-Navarro, J. and Mitchell, A., A review about the impact of multiple sclerosis on health-related quality of life. *Disabil. Rehabil.* 2003. 25: 1291–1303.
- Siebert, R. J. and Abernethy, D. A., Depression in multiple sclerosis: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2005. 76: 469–475.
- Compston, A. and Coles, A., Multiple sclerosis. *Lancet* 2008. 372: 1502–1517.
- Hind, D., Kaklamanou, D., Beever, D., Webster, R., Lee, E., Barkham, M. and Cooper, C., The assessment of depression in people with multiple sclerosis: a systematic review of psychometric validation studies. *BMC Psychiatry* 2016. 16: 278.
- Jadidi-Niaragh, F. and Mirshafiey, A., Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 2011. 74: 1–13.
- Stadelmann, C., Wegner, C. and Brück, W., Inflammation, demyelination, and degeneration—recent insights from MS pathology. *Biochim. Biophys. Acta* 2011. 1812: 275–282.
- Alvarenga-Filho, H., Salles, M., Hygino, J., Ferreira, T. B., Sacramento, P. M., Monteiro, C., Vasconcelos, C. C. et al., Fatigue favors in vitro Th1 and Th17-like cell expansion and reduces corticoid sensitivity in MS patients. *J. Neuroimmunol.* 2017. 303: 81–89.
- D'Mello, C. and Swain, M. G., Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 2017. 31: 73–94.
- Snir, O., Hesselberg, E., Amoudruz, P., Klareskog, L., Zarea-Ganji, I., Catrina, A. L., Padykow, L. et al., Genetic variation in the serotonin receptor gene affects immune responses in rheumatoid arthritis. *Genes Immunity* 2013. 14: 83–89.
- Khan, W. I. and Ghia, J. E., Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clin. Exp. Immunol.* 2010. 161: 19–27.
- Spiller, R. and Lam, C., An update on post-infectious irritable bowel syndrome: role of genetics, immune activation, serotonin and altered microbiome. *J. Neurogastroenterol. Motil.* 2012. 18: 258–268.
- El-Salhy, M., Gundersen, D., Hatlebakk, J. G. and Hausken, T., High densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with lymphocytic colitis. *World J. Gastroenterol.* 2012. 18: 6070–6075.
- Shajib, M. S. and Khan, W. I., The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol.* 2015. 213: 561–574.

- 15 Herr, N., Bode, C. and Duerschmied, D., The effects of serotonin in immune cells. *Front Cardiovasc. Med.* 2017. **4**: 48.
- 16 Katoh, N., Soga, F., Nara, T., Tamagawa-Mineoka, R., Nin, M., Kotani, H., Masuda, K. et al., Effect of serotonin on the differentiation of human monocytes into dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2006. **146**: 354–361.
- 17 Lovett-Racke, A. E., Yang, Y. and Racke, M. K., Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2011. **1812**: 246–251.
- 18 Matusiewicz, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Özenci, V., Fredrikson, S. and Link, H., Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 1999. **5**: 101–104.
- 19 Brucklacher-Waldert, V., Stüerner, K., Kolster, M., Wolthausen, J. and Tolosa, E., Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009. **132**: 3329–3341.
- 20 Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A. et al., Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* 2002. **8**: 500–508.
- 21 Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M. and Stefansson, K., Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol. Med.* 1995. **1**: 732–743.
- 22 Pouly, S., Becher, B., Blain, M. and Antel, J. P., Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000. **59**: 280–286.
- 23 Salehi, Z., Doosti, R., Beheshti, M., Janzamin, E., Sahraian, M. A. and Izad, M., Differential frequency of CD8+ T cell subsets in multiple sclerosis patients with various clinical patterns. *PLoS One* 2016. **11**: 1–13.
- 24 Rolla, S., Bardina, V., De Mercanti, S., Quaglino, P., De Palma, R., Gned, D., Brusa, D. et al., Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- β . *J. Leukoc. Biol.* 2014. **96**: 1–10.
- 25 Wing, A. C., Hygino, J., Ferreira, T. B., Kasahara, M., Barros, P. O., Sacramento, P. M., Andrade, R. M. et al., Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4+ T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology* 2015. **147**: 212–220.
- 26 Zhen, J., Yuan, J., Fu, Y., Zhu, R., Wang, M., Chang, H., Zhao, Y. et al., IL-22 promotes Fas expression in oligodendrocytes and inhibits FOXP3 expression in T cells by activating the NF- κ B pathway in multiple sclerosis. *Mol. Immunol.* 2017. **82**: 84–93.
- 27 Attridge, K., Wang, C. J., Wardzinski, L., Kenefeck, R., Chamberlain, J. L., Manzotti, C., Kopf, M. et al., IL-21 inhibits T cell IL-2 production and impairs Treg homeostasis. *Blood* 2012. **119**: 4656–4664.
- 28 Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J. L. and Stinissen, P., Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J. Immunol.* 2008. **180**: 6411–6420.
- 29 Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J. L., Medaer, R. et al., Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology* 2007. **123**: 79–89.
- 30 Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S. et al., Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-2 receptor α -chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* 2008. **118**: 3411–3419.
- 31 Falcon, S., Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 2009. **9**: 407.
- 32 Ma, A., Xiong, Z., Hu, Y., Qi, S., Song, L., Dun, H., Zhang, L. et al., Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4+CD25+ regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. *Intern Immunopharmacol.* 2009. **9**: 599–608.
- 33 Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J. W. C., Damoiseaux, J. and Hupperts, R., Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *Plos One* 2009. **4**: e6635.
- 34 Schwarz, A., Schumacher, M., Pfaff, D., Schumacher, K., Jarius, S., Balint, B., Wiendl, H. et al., Fine-tuning of regulatory T cell function: the role of calcium signals and naive regulatory T cells for regulatory T cell deficiency in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 2013. **190**: 4965–4970.
- 35 Kalekar, L. A. and Mueller, D. L., Relationship between CD4 regulatory T cells and anergy in vivo. *J. Immunol.* 2017. **198**: 2527–2533.
- 36 Badawy, A. A., Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *J. Psychopharmacol.* 2013. **27**: 878–893.
- 37 Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Höpner, S. et al., Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 2007. **110**: 1225–1232.
- 38 Hesse, S., Moeller, F., Petroff, D., Lobsien, D., Luthardt, J., Regenthal, R., Becker, G. A. et al., Altered serotonin transporter availability in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2014. **41**: 827–835.
- 39 Müller, T., Dürk, T., Blumenthal, B., Grimm, M., Cicko, S., Panther, E., Soricter, S. et al., 5-Hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 2009. **4**: e645.
- 40 Tsuchida, Y., Hatao, F., Fuhisawa, M., Murata, T., Kaminishi, M., Seto, Y., Hori, M. et al., Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via α 7 ACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Neurogastroenterology* 2011. **60**: 638–647.
- 41 Vega Lde, L., Muñoz, E., Calzado, M. A., Lieb, K., Candelario-Jalil, E., Gschaidmeir, H., Färber, L. et al., The 5-HT3 receptor antagonist tropisetron inhibits T cell activation by targeting the calcineurin pathway. *Biochem. Pharmacol.* 2005. **70**: 369–380.
- 42 Maricq, A. V., Peterson, A. S., Brake, A. J., Myers, R. M. and Julius, D., Primary structure and functional expression of the 5-HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991. **254**: 432–437.
- 43 Aminian, A., Noorbakhsh, F., Ghazi-Khansari, M., Kafami, L., Javadi, S., Hassanzadeh, G., Rahimian, R. et al., Tropisetron diminishes demyelination and disease severity in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience* 2013. **248**: 299–306.
- 44 Chabbi-Achengli, Y., Coman, T., Collet, C., Callebert, J., Corcelli, M., Lin, H., Rignault, R. et al., Serotonin is involved in autoimmune arthritis through Th17 immunity and bone resorption. *Am. J. Pathol.* 2016. **186**: 927–937.
- 45 Mohr, D. C., Hart, S. L., Julian, L., Cox, D. and Pelletier, D., Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ* 2004. **328**: 731–735.
- 46 Foley, P., Lawler, A., Chandran, S. and Mead, G., Potential disease-modifying effects of selective serotonin reuptake inhibitors in multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2014. **85**: 709–710.

- 47 Scott, C. F., Jr, Cashman, N. and Spitler, L. E., Experimental allergic encephalitis; treatment with drugs which alter CNS serotonin levels. *J. Immunopharmacol.* 1983. 4: 153–162.
- 48 Gobin, V., Steendam, K. V., Fevery, S., Tilleman, K., Billiau, A. D., Denys, D. and Deforce, D. L., Fluoxetine reduces murine graft-versus-host disease by induction of T cell immunosuppression. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2013. 8: 934–943.
- 49 Xia, Z., Depierre, J. W. and Nassberger, L., Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1b and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. *Immunopharmacology* 1996. 34: 27–37.
- 50 Kubera, M., Lin, A.-H., Kenis, G., Bosmans, E., Van Bockstaele, D. and Maes, M., Anti-inflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon- γ /interleukin-10 production ratio. *J. Clin. Psychopharmacol.* 2001. 21: 199–206.
- 51 Kubera, M., Curztek, K., Majewska-Szczepanik, M., Szczepanik, M., Marcinska, K., Ptak, W., Leskiewicz, M. et al., Inhibitory effect of antidepressant drugs on contact hypersensitivity reaction. *Pharmacol. Rep.* 2012. 64: 714–722.
- 52 Tynan, R. J., Weidenhofer, J., Hinwood, M., Cairns, M. J., Day, T. A. and Walker, F. R., A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav. Immun.* 2012. 26: 469–479.
- 53 Curztek, K., Kubera, M., Majewska-Szczepanik, M., Szczepanik, M., Marcinska, K., Ptak, W., Duda, M. et al., Inhibition of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact hypersensitivity reaction by antidepressant drugs. *Pharmacol. Rep.* 2013. 65: 1237–1246.
- 54 Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. and Hafler, D. A., Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 2004. 199: 971–979.
- 55 Astier, A. L., Meiffren, G., Freeman, S. and Hafler, D. A., Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2006. 116: 3252–3257.
- 56 Haas, J., Schwarz, A., Korporel-Kunke, M., Jarius, S., Wiendl, H., Kieseier, B. C. and Wildemann, B., Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 2015. 21:1521–1532.
- 57 Astier, A. L., Meiffren, G., Freeman, S. and Hafler, D. A., Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 2006. 116: 3252–3257.
- 58 Chen, X., Du, Y., Lin, X., Qian, Y., Zhou, T. and Huang, Z., CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity. *Int. Immunopharmacol.* 2016. 34: 244–249.
- 59 Carreno, B. M., Bennett, F., Chau, T. A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M. L. et al., CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol.* 2000. 165: 1352–1356.
- 60 Ochoa-Repáraz, J. and Kasper, L. H., The influence of gut-derived CD39 regulatory T cells in CNS demyelinating disease. *Transl. Res.* 2017. 179: 126–138.
- 61 Li, Y., Xiao, B., Qiu, W., Yang, L., Hu, B., Tian, X. and Yang, H., Altered expression of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and its 5-HT(1a) receptor in patients with major depression disorder. *J. Affect Disord.* 2010. 124: 68–75.
- 62 McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T. and Cua, D. J., TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat. Immunol.* 2007. 8: 1390–1397.
- 63 Shi, G., Vistica, B., Lovaas, J., Tang, C., Maziz, M. and Igery, I., Pathogenic or non-pathogenic subpopulations of Th17 cells are generated by stimulation of naïve CD4 cells via antigen/APC or anti-CD3/CD28 antibodies (135.10). *J. Immunol.* 2010. 184: 135.
- 64 Peters, A., Lee, Y. and Kuchroo, V. K., The many faces of Th17 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 2011. 23: 702–706.
- 65 Lee, Y. and Kuchroo, V., Defining the functional states of Th17 cells [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research* 2015. 4(F1000 Faculty Rev): 132.
- 66 Kim, S., Lee, H., Lee, G., Oh, S., Shin, M., Shim, I. and Bae, H., CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell depletion modulates anxiety and depression-like behaviors in mice. *PLoS One* 2012. 7: e42054.
- 67 Young, S. N., Acute tryptophan depletion in humans: a review of theoretical, practical and ethical aspects. *J. Psychiatry Neurosci.* 2013. 38: 294–305.
- 68 Karasek, M., Melatonin, human aging, and age-related diseases. *Exp. Gerontol.* 2004. 39: 1723–1729.
- 69 Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J., Alvarez-Sánchez, N., Rodríguez-Rodríguez, A. and Guerrero, J. M., Melatonin: buffering the immune system. *Int. J. Mol. Sci.* 2013. 14: 8638–8683.
- 70 Carrillo-Vico, A., Lardone, P. J., Naji, L., Fernández-Santos, J. M., Martín-Lacave, I., Guerrero, J. M. and Calvo, J. R., Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J. Pineal Res.* 2005. 39: 400–408.
- 71 Reiter, R. J., Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Alatorre-Jimenez, M. and Qin, L., Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J. Pineal Res.* 2016. 61: 253–278.
- 72 Ren, W., Liu, G., Chen, S., Yin, J., Wang, J., Tan, B., Wu, G. et al., Melatonin signaling in T cells: functions and applications. *J. Pineal Res.* 2017. 62: e12394.
- 73 Su, S. C., Hsieh, M. J., Yang, W. E., Chung, W. H., Reiter, R. J. and Yang, S. F., Cancer metastasis: mechanisms of inhibition by melatonin. *J. Pineal Res.* 2017. 62: e12370.
- 74 Sandyk, R. and Awerbuch, G. I., Nocturnal melatonin secretion in multiple sclerosis patients with affective disorders. *Int. J. Neurosci.* 1993. 68: 227–240.
- 75 Akpınar, Z., Tokgöz, S., Gökbel, H., Okudan, N., Uğuz, F. and Yılmaz, G., The association of nocturnal serum melatonin levels with major depression in patients with acute multiple sclerosis. *Psychiatry Res.* 2008. 161: 253–257.
- 76 Álvarez-Sánchez, N., Cruz-Chamorro, I., Díaz-Sánchez, M., Sarmiento-Soto, H., Medrano-Campillo, P., Martínez-López, A., Lardone, P. J. et al., Melatonin reduces inflammatory response in peripheral T helper lymphocytes from relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Pineal Res.* 2017. 63. doi: 10.1111/jpi.12442.
- 77 Wen, J., Ariyannur, P. S., Ribeiro, R., Tanaka, M., Moffett, J. R., Kirmani, B. F., Namboodiri, A. M. et al., Efficacy of N-acetylserotonin and melatonin in EAE model of multiple sclerosis. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2016. 11: 763–773.
- 78 Álvarez-Sánchez, N., Cruz-Chamorro, I., López-González, A., Utrilla, J. C., Fernández-Santos, J. M., Martínez-López, A., Lardone, P. J. et al., Melatonin controls experimental autoimmune encephalomyelitis by altering the T effector/regulatory balance. *Brain Behav. Immun.* 2015. 50: 101–114.
- 79 Anderson, G., Linking the biological underpinnings of depression: role of mitochondria interactions with melatonin, inflammation, sirtuins, tryptophan catabolites, DNA repair and oxidative and nitrosative stress, with consequences for classification and cognition. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2018. 80: 255–266.

- 80 Lim, C. K., Bilgin, A., Lovejoy, D. B., Tan, V., Bustamante, S., Taylor, B. V., Bessede, A. et al., Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci. Rep.* 2017. 7: 41473.
- 81 Sadaka, Y., Verhey, L. H., Shroff, M. M., Branson, H. M., Arnold, D. L., Narayanan, S., Sled, J. G. et al., Canadian Pediatric Demyelinating Disease Network, 2010 McDonald criteria for diagnosing pediatric multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 2012. 72: 211–223.
- 82 Kurtzke, J. F., Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983. 33: 1444–1452.
- 83 Soga, F., Katoh, N., Inoue, T. and Kishimoto, S., Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis. *J. Invest. Dermatol.* 2007. 127: 1947–1955.

Abbreviations: DMT: disease modifying therapies · EDSS: expanded disability status scale · MDD: major depressive disorder

Full correspondence: Dr. Cleonice A. M. Bento, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94; 20.261-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Fax: + 55-21-2531-7906
e-mail: cbento@globocom

Received: 29/1/2018

Revised: 28/3/2018

Accepted: 26/4/2018

Accepted article online: 2/5/2018

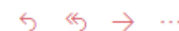
2.2 Artigo 2 – Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients (Artigo submetido)



Brain Behavior and Immunity <em@editorialmanager.com>

Sáb, 10/07/2021 21:11

Para: Você



This is an automated message.

Journal: Brain Behavior and Immunity

Title: Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients

Corresponding Author: Dr Cleonice Alves de Melo Bento

Co-Authors: Priscila M Sacramento; Marisa C Sales; Taissa M Kasahara; Clarice Monteiro; Hugo A Oyamada; Aleida O Dias; Lana Lopes; Camilla T Castro; Átila D Rossi; Lucas M Milioni; Anshu Agrawal; Regina Alvarenga; Claudia Cristina Vasconcelos

Manuscript Number:

Dear Priscila M Sacramento,

The corresponding author Dr Cleonice Alves de Melo Bento has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for Brain Behavior and Immunity.

Submission Title: Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link:

<https://www.editorialmanager.com/bbi/l.asp?i=106523&l=XV8JLFZ5>

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at cbento@unirio.br.

Thank you,

Brain Behavior and Immunity

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/30181/supporthub/publishing/

You will find information relevant for you as an author on Elsevier's Author Hub: <https://www.elsevier.com/authors>

FAQ: How can I reset a forgotten password?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28452/supporthub/publishing/kw/editorial+manager/

For further assistance, please visit our customer service site: <https://service.elsevier.com/app/home/supporthub/publishing/>.

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about Editorial Manager via interactive tutorials. You can also talk 24/7 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/bbi/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Brain Behavior and Immunity

Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39+Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Section/Category:	Immunology
Keywords:	major depressive disorder, multiple sclerosis, Th17 cells, IFN- γ , Treg, CTLA-4, CD39, serotonin
Corresponding Author:	Cleonice Alves de Melo Bento, Ph.D Federal University of the State of Rio de Janeiro: Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro BRAZIL
First Author:	Priscila M Sacramento
Order of Authors:	Priscila M Sacramento Marisa C Sales Taissa M Kasahara Clarice Monteiro Hugo A Oyamada Aleida O Dias Lana Lopes Camilla T Castro Átila D Rossi Lucas M Milioni Anshu Agrawal Regina Alvarenga Claudia Cristina Vasconcelos Cleonice Alves de Melo Bento, Ph.D
Manuscript Region of Origin:	South America
Abstract:	Mood disorders have been associated with risk of clinical relapses in multiple sclerosis (MS), a demyelinating disease mediated by myelin-specific T cells. Here, we aimed to investigate the impact of major depressive disorder (MDD) and cytokine profile of T cells in relapsing remitting MS patients. For our study, plasma and PBMC were obtained from 60 MS patients (30 with lifetime MDD) in remission phase. The PBMC cultures were stimulated with mitogen or myelin basic protein (MBP), and effector and regulatory T cell phenotypes were determined by flow cytometry. The cytokine levels, both in the plasma or in the supernatants collected from PBMC cultures, were quantified by Luminex. In some experiments, the effect of serotonin (5-HT) was investigated. Here, higher Th17-related cytokine levels in response to mitogen and MBP were dosed in the plasma and PBMC cultures of the MS/MDD group in comparison with MS patients. Further, elevated frequency of CD4+ and CD8+ T cells capable of producing IL-17, IL-22 and GM-CSF was observed in depressed patients. Interestingly, the percentage of myelin-specific IFN- γ +IL-17+ and IFN- γ +GM-CSF+ CD4+ T cells directly correlated with neurological disabilities. In contrast, the occurrence of MDD reduced the proportion of MBP-specific CD39+Tregs subsets. Notably, the severity of both neurological disorder and depressive symptoms were inversely correlated with these Tregs. Finally, the addition of 5-HT downregulated the release of Th17-related cytokines in response to mitogen and myelin antigen. In

	summary, our findings suggested that recurrent major depression, by favoring imbalances of effector Th17 and Treg cell subsets, contributes to MS severity.
Suggested Reviewers:	David C Mohr d-mohr@northwestern.edu He has published a very important study about major depression and MS activity
	Daniel Duerschmied daniel.duerschmied@universitaets-herzzentrum.de he has expertise in the effects of serotonin on the immune system.
	Sudhir Gupta sgupta@hs.uci.edu He has expertise in T cell functions
Opposed Reviewers:	

Cover Letter



FEDERAL UNIVERSITY OF STATE OF RIO DE JANEIRO

Frei Caneca, 94/CENTRO
22220-040 Rio de Janeiro
Rio de Janeiro/Brazil
Tel: 55 21 2531-7906

10 July 2021.

To: Dear Editor from *Brain, Behavior, and Immunity*

Dear Sir or Madam

We are sending you the revised article entitled “**Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients**” to be considered for publication in the *International Brain, Behavior, and Immunity*. As corresponding author of the work entitled, I certify that the submission was approved by all co-authors. This study was not performed in animals, but in peripheral blood of human beings after approval by the Ethical Committee for Research on Human Subjects of the Federal University of State of Rio de Janeiro (UNIRIO)/Brazil. Blood samples were only collected after permission, oral and written, from each research subject. Moreover, as corresponding author, I warrant that the manuscript has not been submitted for publication elsewhere and that all the authors of the paper have read and have given their approval of the manuscript. Furthermore, none of the authors has any potential financial conflict of interest related to the manuscript. Finally, I also state that no other related work is “in press” or under consideration for publication elsewhere.

I look forward to hearing from you, and thank you in advance.

Kind regards,

Cleonice Alves de Melo Bento, PhD.
Head Professor of Immunology
Department of Microbiology and Parasitology
Federal University of Rio de Janeiro State, Brazil
+ 55 21 2531-7906

Highlights

Highlights

Depression favors expansion of myelin-specific Th17 cell subsets in MS patients.

Lower frequency of myelin-specific CD39⁺Treg cells was seen in depressed MS patients.

In MS, severity of depression positively correlated with Th17-like cells percentage.

In MS, severity of depression inversely correlated with CD39⁺Treg cell subsets.

In MS, 5-HT reduced *in vitro* the release of myelin-specific Th17-related cytokines.

Major depression favors the expansion of Th17-like cells and decrease the proportion of CD39⁺Treg cell subsets in response to myelin antigen in multiple sclerosis patients

Th17/Treg axis, MS and depression

Priscila M. Sacramento^{1,4}, Marisa C. Sales^{1,4}, Taissa M. Kasahara¹, Clarice Monteiro⁵, Hugo A.A. Oyamada^{1,4}, Aleida S.O. Dias^{1,4}, Lana Lopes^{1,4}, Camilla T. Castro^{1,4}, Átila D. Rossi⁶, Lucas M. Milioni⁶, Anshu Agrawal⁷, Regina Alvarenga³, Cláudia Cristina Vasconcelos³, Cleonice A. M. Bento^{1,2,3}

From the ¹Department of Microbiology and Parasitology, ²Department of General Medicine Department and ³Post-graduate Program in Neurology/Federal University of the State of Rio de Janeiro, ⁴Post-graduate Program in Microbiology/University of the State of Rio de Janeiro, ⁵Department of Immunology and ⁶Department of Genetics /Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, ⁷University of California, Irvine, CA, USA

Corresponding author: Dr. Cleonice A. M. Bento, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Frei Caneca 94; 20.261-040, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Tel.: + 55-21-2531-7906; Fax: + 55-21-2531-7906; e-mail address: cbento@unirio.br

Keywords: major depressive disorder, multiple sclerosis, Th17 cells, IFN- γ , Treg, CTLA-4, CD39, serotonin

Conflict of Interest: The authors declare no commercial or financial conflict of interest.

Abstract

Mood disorders have been associated with risk of clinical relapses in multiple sclerosis (MS), a demyelinating disease mediated by myelin-specific T cells. Here, we aimed to investigate the impact of major depressive disorder (MDD) and cytokine profile of T cells in relapsing remitting MS patients. For our study, plasma and PBMC were obtained from 60 MS patients (30 with lifetime MDD) in remission phase. The PBMC cultures were stimulated with mitogen or myelin basic protein (MBP), and effector and regulatory T cell phenotypes were determined by flow cytometry. The cytokine levels, both in the plasma or in the supernatants collected from PBMC cultures, were quantified by Luminex. In some experiments, the effect of serotonin (5-HT) was investigated. Here, higher Th17-related cytokine levels in response to mitogen and MBP were dosed in the plasma and PBMC cultures of the MS/MDD group in comparison with MS patients. Further, elevated frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells capable of producing IL-17, IL-22 and GM-CSF was observed in depressed patients. Interestingly, the percentage of myelin-specific IFN- γ ⁺IL-17⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ CD4⁺ T cells directly correlated with neurological disabilities. In contrast, the occurrence of MDD reduced the proportion of MBP-specific CD39⁺Tregs subsets. Notably, the severity of both neurological disorder and depressive symptoms were inversely correlated with these Tregs. Finally, the addition of 5-HT downregulated the release of Th17-related cytokines in response to mitogen and myelin antigen. In summary, our findings suggested that recurrent major depression, by favoring imbalances of effector Th17 and Treg cell subsets, contributes to MS severity.

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating autoimmune disorder of the central nervous system (CNS) mediated by myelin-specific T cells that attack the myelin sheath of any area of the CNS, leading to sensory, autonomic, cognitive, and motor function deficits (Milo and Miller, 2014; MSIF, 2013). In the majority of patients (> 80%), the disease progresses according to clinical relapses followed by remission, named relapse-remitting (RRMS) form (Schumacher et al, 1965). To reduce inflammatory-mediated myelin sheath damage, RRMS patients are treated with immunomodulatory drugs, known as disease-modifying therapy (DMTs) (Robertson and Moreo, 2016). Nevertheless, even under DMT, like other autoimmune conditions, MS is a heterogenic disease influenced by genetic and environmental conditions, such as major depressive disorder (MDD).

The association between MS and MDD has been known for some time (Hind et al, 2016; Palé et al, 2017). Lifetime prevalence of depression is at least three times the rate in MS patients than in the general population (Hind et al, 2016; Palé et al, 2017), and mood disorders have been associated with risk of clinical relapses (Mohr et al, 2004). Further, in addition to the disease being characterized by increased physical disability over time (Rudick et al, 1997), some symptoms, such as fatigue and cognitive impairment, are also commonly associated with depression (Benito-León et al, 2003; Compston and Coles, 2008; Siegert and Abernethy, 2005).

It is known that MDD is associated with elevated levels of circulating pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Goldsmith et al, 2016), and lower availability of serotonin (5-HT) (Cowen and Browning, 2015). Apart from its role in regulating mood, cognition, sleep and appetite, this neurotransmitter plays different immunomodulatory roles on T cells (Arreola et al, 2015), the main lymphocytes that coordinate myelin sheath damage in MS.

Evidence has suggested the pivotal role of different myelin-specific Th17 cell subsets in RRMS pathogenesis. High levels of IL-17A (IL-17), associated with increased frequency of Th17

cells, have been observed in patients during clinical relapses (Brucklacher et al, 2009; Matusevicius et al, 1999; Tzartos et al, 2008). Moreover, the proportion of myelin-specific Th17 cells was associated with radiological activity of the disease, identified by the number of active brain lesions in MRI scans (Wing et al, 2016). Due to the surface expression of CCR6, human Th17 cells are more efficient in migrating into the CNS than Th1 lymphocytes, since endothelial cells from choroid plexus express high levels of CCR6 ligand, the CCL20 chemokine (Reboldi et al, 2009). Nonetheless, IFN- γ ⁺ T cells have been detected in both cerebrospinal cord fluid (CSF) and around the apoptotic oligodendrocyte (Lovett-Racke et al, 2011; Restorick et al, 2017). In MS, the *in situ* production of IFN- γ , a classical Th1-related cytokine, may also be originated by encephalogenic IFN- γ -secreting Th17 cell subset (Ferreira et al, 2017; Kebir et al, 2009). However, after myelin-specific Th17 cell subset migration, astrocyte, and microglia activation and then blood-brain barrier (BBB) disruption (Lécuyer et al, 2016), peripheral activated antigen-specific Th1 cells can more easily access the CNS. In addition to IL-17 and IFN- γ , some pathogenic Th1/Th17 cell subsets in MS have been associated with production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). In a murine model of MS, named experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), GM-CSF is essential for the development and progression of the disease (Ponomarev et al, 2007). Rasouli et al. (2015) demonstrated a higher production of GM-CSF by peripheral T cells from untreated MS patients than those from successfully IFN- β -treated MS patients. Furthermore, elevated frequency of GM-CSF-secreting (CD4⁺ and CD8⁺) T cells co-expressing IL-17 or IFN- γ was detected in brain lesions in MS patients (Rasouli et al, 2015). Finally, IL-22, released by activated Th17 or Th22 cells (Tzartos et al, 2008), have also been implicated in the disease. A study published by our group (Wing et al, 2016) demonstrated a direct correlation between the number of active brain lesions and the proportion of IL-22-secreting CD4⁺ T cells in response to myelin basic protein (MBP), one of the antigens believed to induce the T cells implicated in the process of demyelination of nerves in the CNS (Bruno et al, 2002). Moreover, a study by Rolla et al. (2014)

demonstrated an increase of myelin-specific Th22 cells just prior to clinical relapses in RRMS patients. Since IL-22⁺ T cells express CCR6, their access to the CNS is also facilitated (Zhong et al, 2017). It is believed that all myelin-specific T cell-derived cytokines, along with IL-6 and IL-1 β , produced activated astrocytes and local (microglia) and migrating (monocytes) innate cells, which should lead to oligodendrocyte apoptosis and break down of both the BBB and myelin sheath by releasing a broad arsenal of cytotoxic mediators, such as reactive oxygen intermediates and matrix metalloproteinases (MMPs) (Ortiz et al, 2013).

In addition to expanded effector pathogenic T cells, functional deficiencies of CD25^{high} FoxP3⁺ regulatory CD4⁺ T cells (Tregs) and Tr1 cells (IL-10⁺FoxP3⁻) have been described in MS patients during clinical relapses (Astier et al, 2006; Haas et al, 2014; Viglietta et al, 2004). In addition to producing anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, the high expression of CD25 by Tregs may reduce effector T cell action by taking up exogenous IL-2 (Arce-Sillas et al, 2016). Moreover, the expression of CD152 on Tregs, by blocking co-stimulated molecules CD80 and CD86 expressed on immunogenic dendritic cells (DCs) may, indirectly contribute to controlling inflammation by inhibiting effector pathogenic T cells (Arce-Sillas et al, 2016). More recently, lower frequency of CD39⁺ Tregs was observed in non-depressed MS patients when compared with healthy subjects (Sacramento et al, 2018). CD39 and CD73 degrade the extracellular adenosine triphosphate molecule in adenosine monophosphate, a metabolite with immunosuppressive action on effector T cells (Ochoa-Repáraz and Kasper, 2017). Notably, Sacramento et al. (2018) demonstrated the ability of 5-HT in attenuating the production of Th1/Th17-related cytokines in polyclonally-activated T cell cultures from non-depressed RRMS patients. Additionally, this neurotransmitter increased both the frequency and function of CD39⁺ Tregs. Despite these findings, little is known about the impact of MDD and the effect of serotonin on the *in vitro* MS-derived T-cell behavior in response to mitogens and myelin antigen, which was the objective of the present study.

2. Material and Methods

2.1 Patients

For this study, 60 RRMS patients, diagnosed according to the McDonald criteria (2010), were recruited from Gafree Guinle University Hospital/UNIRIO (Rio de Janeiro, Brazil) during remission phase. Half of the patients suffered from persistent major depression (MS/MDD). At the time of blood sampling, the severity of depressive symptoms was evaluated by Beck depression inventory (BDI) and neurological disabilities determined through the expanded disability status scale (EDSS) (Kurtzke, 1983). Demographic data, such as gender, disease duration, and treatment with DMTs were obtained from medical records (**Table 1**). Patients that were treated with interferon were excluded, due to the association of this treatment with depression (Palé et al, 2017). We also excluded MS patients with other autoimmune disorders. For some experiments, 30 non-MS, age and sex matched individuals, 15 without (Control, Ctrl) and 15 with MDD, were also recruited. Those undergoing treatment with antidepressants and anxiolytics, smokers and those with acute infectious diseases were excluded from both MS and non-MS groups. After a complete description of the study to participants, written informed consent was obtained from each individual. The study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Subjects of the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO).

2.2 Cell cultures and stimuli

For our study, 20 mL of peripheral blood was collected from participants in heparin-containing tubes, and both plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by centrifugation on Ficoll–Hypaque density gradients. After counting cells in trypan blue solution (10% v/v), viable PBMC ($1 \times 10^6/\text{mL}$) were suspended in RPMI-1640 medium supplemented with 2μM of L-glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, USA), 10% fetal calf serum (FCS), 20U/mL of penicillin, 20μg/mL of streptomycin and 20mM of HEPES buffer. The cells were cultured in 24-

well plates for 3 days in the absence of stimulus (medium alone) or in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads (25 μ l/mL) (Dynalbeads, Gibco, Grand Island, NY). To evaluate the antigen (Ag)-specific response, some cell cultures were stimulated with 10 μ g/mL of myelin basic protein (MBP) (Sigma Chemicals, St Louis, MD) plus 20 U/mL of human recombinant IL-2 for 5 days. In some experiments, PBMC cultures were treated with 200 ng/mL of 5-HT. The dose of serotonin used here was based on the study performed by Soga et al. (2007) and represents the physiological brain concentration of this neurotransmitter (Fernstrom and Wurtman, 1973). The cell cultures were maintained at 37° in a humidified 5% CO₂ incubator during incubation.

2.3 Cell proliferation

The cell proliferation in response to mitogen and MBP/IL-2 was evaluated by [³H] thymidine uptake, added to the PBMC cultures at 4 μ Ci/well 8 h prior to the end of the incubation period. The cells were harvested in glass fiber filters in an automatic cell harvester and radioactive incorporation was quantified using a liquid-scintillation counter. The results were shown as mean $\pm$ sd of counts per minute (cpm).

2.4 Flow cytometry analysis

To determine the frequency of different effector and regulatory T cell subsets, mouse anti-human monoclonal antibodies (mAbs) directed against surface [CD3-SB436 (UCHT1), CD4-SB600 (SK3), CD8-SB702 (RPA-T8), CD25APC (BC96), CD39-FITC (eBioA1), and CD152-APC-eFluor780 (14D3)] and intracellular [IL-17-PE-eFluor 610 (eBio64DEC17), IFN- γ -APC-eFluor780 (4S.B3), GM-CSF-PerCP-Cy5.5 (BVD2-21C11), IL-22-FITC (22URTI), IL-10-PE-Cy7 (JE53-9D7), FoxP3-PECy5.5 (PCH101) and CD152-APC-eFluor 780 (14D3)] markers, as well as isotype control antibodies, were purchased from eBioscience™ (Thermo Fischer Scientific). To optimize intracellular cytokine detection, at the end of the incubation period, cell cultures were restimulated

for 3 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20 ng/mL; Sigma-Aldrich) plus ionomycin (IO, 600 ng/mL; Sigma-Aldrich) in the presence of brefeldin A (10 µg/mL; Sigma-Aldrich). Briefly, the PBMC were incubated with different mAbs combinations for surface markers at room temperature in the dark, according to manufacturer's instructions. After 30 min, the cells were washed with PBS+2%FBS at room temperature before cell permeabilization, that was performed by incubating cells at 4°C for 20 min with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Pharmingen, San Diego, CA). After washing, the different combinations of mAbs against intracellular makers were added and incubated for a further 30 min at 4°C. The cells were acquired on Attune NxT flow cytometers (Thermo Fisher Corporation) and analyzed using FlowJo. Isotype control antibodies and single-stained samples were used to periodically check the settings and gates on the flow cytometer. After acquisition of 200,000 to 250,000 events, lymphocytes were gated based on forward and side scatter properties after the exclusion of dead cells, using propidium iodide [PI⁺ cells mean: 4.31% (range 1.3 to 8.7%)], and doublets.

2.5 *In vivo* and *in vitro* cytokine production quantification

The quantification of different cytokines in plasma and in supernatants from polyclonal and myelin-specific activated cells was determined applying the Luminex technique, and using the "Th1/Th2/Th9/Th17 Cytokine 18-plex human Panel" kit (InvitroGen, San Diego, CA, USA), following manufacturer's instructions. The multiplex enzyme immunoassay based on magnetic beads was used to measure the production of IFN-γ, TNF-α, GM-CSF, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-22, IL-21 and IL-23 in plasma and culture supernatant.

2.6 Statistical analysis

The statistical analysis was performed using Prism 8.0 software (GraphPad Software). All immunological evaluations were performed in triplicate for each individual and the intra-assay

variability ranged from 9.2% to 13.1% (median value of 10.3%) as calculated by the software above. The nonparametric Mann-Whitney U test and the Student's t test were applied to determine whether the two groups (MS x MS/MDD or control x MDD) were statistically different for nonparametric and parametric variables, respectively. Correlations between parametric and nonparametric variables were investigated using Pearson's and Spearman's correlations, respectively. Significance in all experiments was $p < 0.05$.

3. Results

3.1 The occurrence of major depression favors the release of Th17-related cytokines implicated in MS activity and depression severity.

For the present study, 60 RRMS patients, 30 with (MS/MDD) and 30 without (MS) major depressive disorder (MDD), were recruited. No difference in age or sex was observed between the two groups, and mean disease duration and EDSS score were similar (**Table 1**). Concerning the DMT scheme, some patients were under treatment with natalizumab (7 MS x 8 MS/MDD), glatiramer acetate (7 MS x 7 MS/MDD), dymetil fumarate (4 MS x 6 MS/MDD) and teriflunomide (2 MS x 2 MS/MDD). No statistical difference was observed with regard to immunological assays between patients under different DMT schemes (data not shown). The severity of depressive symptoms was classified into mild (n=12, 40%), moderate (n=8, 27%) and severe (n=10, 33%) according to BDI.

It is known that both MDD and MS involve imbalances in cytokine production (Goldsmith et al, 2016; Lovett-Racke et al, 2011). With regard to the *in vivo* cytokine profile, higher levels of IL-1 β (**Fig. 1A**), IL-6 (**Fig. 1B**) and IL-17 (**Fig. 1F**), associated with a lower concentration of IL-10 (**Fig. 1H**), were observed in the plasma of MS/MDD patients when compared with the MS group. No difference between the two patient groups was observed for IL-23 (**Fig. 1C**), IL-12 (**Fig. 1D**), TNF- α (**Fig. 1E**) and IL-22 (**Fig. 1G**). Concerning neurological disorders, a positive correlation was observed between EDSS score and the circulating levels of IL-1 β , IL-6, IL-23, IL-12, TNF α and IL-17 (**Table 2**). Also, the severity of depressive symptoms, evaluated using the BDI scale, was directly correlated with plasma levels of IL-1 β and IL-17 and inversely correlated to IL-10 concentrations (**Table 2**). As control for MDD, the cytokine profile of 30 age- and gender-matched non-MS subjects (15 healthy and 15 with MDD) was also evaluated. As demonstrated in figure S1A, the occurrence of depression indeed elevated plasma levels of IL-1 β and TNF- α (**Fig. S1A**).

In order to evaluate the impact of depression on cell proliferation and cytokine profile by MS-derived T lymphocytes, PBMC cultures were activated with anti-CD3/CD28 beads (α CD3/CD28). As demonstrated in figure 2, although T cell proliferation was lower in the MS/MDD group (**Fig. 2A**), higher levels of IL-6 (**Fig. 2B**) and IL-17 (**Fig. 2G**) were released by these cells as compared with MS patients. In contrast, lower levels of IL-2 (**Fig. 2E**), IFN- γ (**Fig. 2F**) and IL-10 (**Fig. 2J**) were detected in MDD/MS cell cultures. In non-MS subjects, elevated levels of IL-6, TNF- α , GM-CSF and IL-17 and were also produced by activated T cells from MDD individuals as compared with healthy subjects (control, Ctrl) (**Fig. S1B**). In addition, the occurrence of depression also diminished IFN- γ production (**Fig. S1B**). With regard to antigen-specific response, although no difference in the cell proliferation was observed between the two groups of MS patients (**Fig. 3A**), higher levels of IL-6 (**Fig. 3B**), GM-CSF (**Fig. 3C**), IL-21 (**Fig. 3F**) and IL-22 (**Fig. 3G**) were noted in the supernatants from MBP/IL-2-activated cell cultures of depressive patients. On the other hand, MS/MDD cell cultures released lower amounts of IFN- γ (**Fig. 3D**) and IL-10 (**Fig. 3H**). Notably, neither medium (none) nor IL-2 alone were able to induce detectable and reproductive cytokines (data not shown).

Concerning clinical parameters, IL-17 and GM-CSF levels in mitogen-stimulated cell cultures were positively associated with neurological disabilities (**Table 3**). The same correlation was observed between IL-6, released by MBP/IL-2-activated cell cultures, and the EDSS score (**Table 3**). Also, a direct correlation was observed between the severity of depressive symptoms and IL-6 and IL-17, produced by mitogen-activated cells, and IL-6, IL-17, IL-21, IL-22 and GM-CSF, released by Ag-specific cells (**Table 3**). In contrast, a higher BDI score inversely correlated with IL-10 and IFN- γ produced by mitogen- and MBP-stimulated cell cultures (**Table 3**).

3.2 The impact of major depression on the frequency of cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and MS patients

Evidence suggests that myelin-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells that are able to produce IL-17, IFN- γ , IL-22 and GM-CSF play a pivotal role in MS pathogenesis (Ferreira et al, 2017; Lécuyer et al, 2016; Lovett-Racke et al, 2011; Rasouli et al, 2015; Restorick et al, 2017, Rolla et al, 2014; Wing et al, 2016). In order to assess the impact of depression on the frequency of these cells, PBMC cultures from MS patients were stimulated with anti-CD3/CD28 beads and then analyzed by flow cytometry following the gating strategy shown in **figure 4A**. The mitogen activation elevated the percentage of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells capable of producing GM-CSF (**Fig. 4B** and **4F**), IFN- γ (**Fig. 4C** and **4G**), IL-17 (**Fig. 4D** and **4H**) and IL-22 (**Fig. 4E** and **4I**) in samples from MS and MS/MDD patients. Nonetheless, the proportion of IL-17⁺CD4⁺ (**Fig. 4D**) and IL-17⁺CD8⁺ (**Fig. 4H**) T cells was significantly higher in the MDD group. With regard to Ag-specific response, and taking into account the gating strategy shown in **figure 5A**, the addition of MBP/IL-2 elevated the *in vitro* proportion of GM-CSF⁺ (**Fig. 5B**) and IL-22⁺ (**Fig. 5E**) CD4⁺ T cells in both MS patient subgroups. The percentage of myelin-specific IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells was significantly elevated only in MS cell cultures (**Fig. 5C**). MBP/IL-2 stimulation did not alter the IL-17⁺ cells (**Fig. 5D**). By comparing both groups of patients, antigenic protein was more potent in elevating the frequency of IFN- γ ⁺ cells in MS (**Fig. 5C**) and IL-22⁺ (**Fig. 5E**) cells in MS/MDD cell cultures. Interestingly, even in the absence of stimulus, the proportion of GM-CSF⁺ (**Fig. 5B**) and IL-22⁺ (**Fig. 5E**) CD4⁺ T cells after 5 days of culturing was significantly higher in MS/MDD patients. Among CD8⁺ T cells, while MBP/IL-2 increased the percentage of IL-22⁺ cells in both groups of patients (**Fig. 5I**), this antigen elevated the proportion of GM-CSF cells⁺ in PBMC cultures from MS/MDD but not MS cultures (**Fig. 5F**). In contrast, lower frequency of IFN- γ ⁺CD8⁺ T cells was observed in MDD patients (**Fig. 5G**). No difference was seen with regard to IL-17⁺ cells between MS and MS/MDD groups (**Fig. 5H**). Interestingly, among all cell phenotypes evaluated here, only the frequency of myelin-specific IL-17⁺ and IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells was directly correlated with EDSS score (**Table 4**).

When the combination of different cytokines was analyzed (**Fig. 6A**), the frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁺ (**Fig. 6B**) and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ (**Fig. 6C**) CD4⁺ T cells in response to mitogen was higher in MS/MDD than MS cultures. In MBP/IL-2-stimulated cell cultures, no difference was observed regarding the proportion of different dual cytokine-producing CD4⁺ T cell between MS subgroups (**Fig. 7**). Nonetheless, among multi-cytokine producing CD4⁺ T cells, the frequency of MBP-specific IFN- γ ⁺IL-17⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ CD4⁺ T cells was directly correlated with neurological disabilities of patients (**Table 5**). Also, patients with a higher EDSS score tended to present a higher percentage of antigen-specific GM-CSF⁺ IL-17⁺CD4⁺ T cells ($p=0.0522$) (**Table 5**). Unfortunately, the very low frequency of CD8⁺ T cells able to produce different combinations of cytokines after mitogen and antigen stimulation made any further analysis impossible.

3.3 Lower frequency of regulatory CD39⁺CD4⁺ T cell subsets was observed in depressed MS patients

Previous results published by our group demonstrated a lower frequency of regulatory CD4⁺ T cells capable of expressing CD39 in non-depressed MS patients when compared to healthy individuals (Sacramento et al, 2018). CD39 is a marker related to the functional efficiency of regulatory T cells (Ochoa-Repáraz and Kasper, 2017). Here, taking into account the gating strategy shown in **figures 7A** and **7B**, the polyclonal activation of CD4⁺ T cells only increased the percentage of CD39⁺CD4⁺T cells capable of expressing FoxP3 and IL-10 in cell cultures from patients without depression (**Fig. 7C** and **7D**). Similarly, the frequency of CD39⁺ CD25⁺ CD4⁺ T cells positive for FoxP3 (**Fig. 7F**) and IL-10 (**Fig. 7G**) were significantly higher in samples from patients without depression compared to the MDD group. Furthermore, the proportion of CD39⁺ (**Fig. 7E**) and CD39⁺CD25⁺ (**Fig. 7H**) cells positive for CTLA-4 among polyclonally-activated CD4⁺ T cells was also significantly higher in the group without depression. Furthermore, taking into account the gating strategy shown in figure 7I, the proportion of CTLA-4⁺ CD39⁺ (**Fig. 7J**

and 7K) and CTLA-4⁺CD39⁺CD25⁺ (Fig. 7L and 7M) CD4⁺ T cells able to produce, or not, IL-10 was significantly lower in patients with MS/MDD than in patients with only MS. In cultures stimulated with MBP/IL-2, no difference was observed regarding the percentage of CD39⁺ and CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells capable of expressing FoxP3 (Fig. 8C and 8F) or IL-10 (Fig. 8D and 8F) between the two groups of patients. However, the percentage of CTLA-4⁺IL-10⁻ (Fig. 8E and 8H) and CTLA-4⁺IL-10⁺ (Fig. 8J and Fig. 8L) gated on CD39⁺ or CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cell subsets after antigen stimulation was significantly higher in patients without depression. The frequency of MBP-specific CTLA-4⁺IL-10⁺ was very low with no difference between the groups of patients being observed (Fig. 8K and 8M). Interestingly, among different regulatory CD4⁺ T cell phenotypes analyzed in the present study, the proportion of CTLA-4⁺IL-10⁻ CD39⁺ and CTLA-4⁺IL-10⁻CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells, following mitogen activation or MBP/IL-2 stimulation, was negatively correlated with severity of depressive symptoms (Table 6). Also, the frequency of antigen-specific CD39⁺CD25⁺CD4⁺ T cells was negatively correlated with EDSS scores (Table 6).

3.4 The *in vitro* addition of serotonin modulates the release of cytokines by polyclonally-activated and myelin-specific-stimulated cells

A previous study published by us (Sacramento et al, 2018) reveled the ability of serotonin (5-HT) to reduce the release of pro-inflammatory cytokines and up-regulate regulatory CD4⁺ T cells in polyclonally-activated T cells in MS patients without MDD. Here, a physiological dose of 5-HT reduced the production of IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-17, IL-21 and IL-22, and increased the release of IL-10 not only in mitogen-activated PBMC cultures from non-depressive MS patients but also in MS/MDD patients (Fig. 9 A). Additionally, the levels of IL-6, IFN- γ , GM-CSF, IL-17, IL-21 and IL-22 produced by MBP-stimulated cells were also decreased after 5-HT addition (Fig. 9B), but no change in the IL-10 secretion was observed in these cell cultures (Fig. 9B).

4. Discussion

The lifetime prevalence of major depression in MS patients is at least three times the rate observed in the general population (Palé et al, 2017), and mood disorders have been associated with risk of clinical relapses (Mohr et al, 2004). Despite a lack of studies investigating the molecular and cellular mechanisms behind this adverse relationship, it may involve cytokine production (Fernstrom and Wurtman, 1973; Soga et al, 2007). In RRMS, some cytokines have been associated with recurrent demyelinating of the myelin sheath in any area of the CNS, thus leading to sensory, autonomic, cognitive, and motor function deficits (Milo and Miller, 2014; MSIF, 2013). Although preliminary, the results presented here are original and reveal the impact of MDD in favoring the expansion of circulating encephalitogenic T cell subsets with enhanced responsiveness to myelin antigen. This phenomenon should be associated with the known imbalance of cytokines in MDD subjects.

Firstly, higher levels of IL-1 β , IL-6 and IL-17 were observed in the plasma of MS/MDD than MS patients. Also, even while inducing lower T cell proliferation, probably due to lower endogenous IL-2 production (Bachmann and Oxenius, 2007), the production of IL-6 and IL-17 by these cells in response to mitogen was also higher among depressed MS patients. Concerning the T cell subsets, a higher frequency of IL-17⁺(CD4⁺ and CD8⁺) T cells was observed in polyclonally-activated PBMC cultures. In line with others authors (Goldsmith et al, 2016), elevated plasma levels of IL-1 β and TNF- α , as well as a higher release of IL-6, TNF- α , GM-CSF and IL-17 by mitogen-activated T cells, were observed by our group in samples of non-MS depressed subjects when compared with healthy individuals. Notably, the occurrence of depression also altered the sensibility of PBMC to MBP stimulation, one of the autoantigens expressed on the myelin sheath and implicated in MS etiology (Bruno et al, 2002). The levels of IL-6, GM-CSF, IL-21 and IL-22 released by MBP-stimulated cells was higher in MS/MDD than MS patients. In these cell cultures, the occurrence of depression elevated the percentage of myelin-specific IL-22⁺CD4⁺ T cells and GM-CSF⁺CD8⁺ T cells. These

findings suggested that major depression should indeed favor the expansion of T cell phenotypes correlated with MS severity.

In line with this, the plasma levels of IL-1 β , IL-6, IL-12 and IL-23 were directly correlated with neurological disorders, determined by EDSS score. Also, the severity of depressive symptoms, evaluated by BDI, positively correlated with circulating concentrations of IL-1 β , TNF- α and IL-17. *In vitro*, production of IL-17 and GM-CSF, as well as IL-17 and IL-6, by mitogen-activated T cells were directly correlated with EDSS and BDI scores, respectively. Finally, in MBP-stimulated cell cultures, while the severity of neurological disorders correlated directly with IL-6, the BDI score positively correlated with IL-6, IL-17, IL-21, IL-22 and GM-CSF. With regard to the T cell subsets, the percentage of Ag-specific IL-17⁺CD8⁺ T cells was detected in MS patients with an elevated EDSS score. These results suggested that Th17-related cytokine production has been implicated in both myelin sheath damage and depression severity.

In agreement with these findings, elevated levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α have been associated with severity of depressive symptoms in the general population (Ting et al, 2020; Zou et al, 2018). Keaton et al. (2019) revealed that high IL-6 levels are linked to greater risk of suicide. In RA patients, depression was associated with elevated IL-6 production and disease severity (Li et al, 2019; Sambamoorthi et al, 2017; Vos et al, 2016). In the context of MS, some cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and IL-23, contribute to pathogenesis by different mechanisms. During the clinical remission phase, circulating levels of IL-1 β , which have been associated with elevated expression of NLRP3 inflammasome in MS-derived PBMC (Govindarajan et al, 2020), were predictive of disease progression (Rossi et al, 2014). Along with IL-6, IL-1 β helps IL-23 to induce the final differentiation and expansion of highly encephalitogenic Th17 cells, identified by dual production of IL-17 and IFN- γ or the combination of IL-17 with GM-CSF (Angelou et al, 2020; Hiltensperger and Korn, 2018). Further, by elevating CCR6 expression, IL-1 β favors the homing of myelin-specific T cells into CNS microenvironment (Brucklacher-Waldert et al, 2009; Duhon et al, 2014).

IL-21 should also contribute to disease progression by providing a positive feedback loop for Th17 survival (Shi et al, 2019).

In the present study, although no difference with regard to proportion of different multi-cytokine CD4⁺ T cell subsets in response to MBP was observed between MS and MS/MDD patients, the frequency of IL-17⁺IFN- γ ⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF CD4⁺ T cells was higher in depressed MS patients. The lack of difference between the two groups of patients in response to the myelin antigen may be explained by two non-exclusive mechanisms. Firstly, the existence of other CD4⁺ T cell clones directed against other myelin sheath antigens among polyclonally-expanded T cells, such as MOG and PLP (Bruno et al, 2020), and secondly, the small sample size tested in the study. Nonetheless, and interestingly, the percentage of both MBP-specific IL-17⁺IFN- γ ⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF CD4⁺ T cells positively correlated with neurological disabilities. Unfortunately, the very low percentage of multi-cytokine producing CD8⁺ T cells in most patients precluded any further analysis. However, the frequency of myelin-specific IFN- γ ⁺ CD8⁺ T cells was positively correlated with EDSS score. These findings suggested that, even while releasing lower IFN- γ levels in response to both mitogen and MBP, in line with other studies (Ferreira et al, 2017; Kebir et al, 2009; Lovett-Racke et al, 2011; Rasouli et al, 2015; Restorick et al, 2017), IFN- γ -secreting T cell subsets may contribute to MS pathogenesis, mainly those capable of producing GM-CSF (Lécuyer et al, 2016). Elevated levels of GM-CSF-secreting (CD4⁺ and CD8⁺) T cells co-expressing IFN- γ were detected in brain lesions of MS patients (Rasouli et al, 2015). The production of GM-CSF by encephalitogenic CD4⁺ T cells may contribute to MS pathogenesis by inducing recruitment and activation of monocytes into CNS (Lofti et al, 2019).

Although Th17 cells can release IL-22, abundant amounts of IL-6 and TNF- α can induce Th22 cells (Duhon et al, 2009). Th22 cells, many of them specific for MBP, have been associated with both clinical relapse rates (Rolla et al, 2014) and the number of active brain lesions (Wing et al, 2016). Interestingly, in the present study, elevated levels of IL-6 and TNF- α , associated with

expansion of IL-22⁺CD4⁺ T cells, was observed in myelin-stimulated PBMC cultures from MS/MDD. Notably, the frequency of MDD-derived CD4⁺ T cells positive for IL-22 and GM-CSF at baseline was significantly higher than in MS patients, and it indicated a presence of pre-activated CD4⁺ T cells that was more evident after 5 days of culturing, maybe involving residual peptide presentation by endogenous APC. These results suggested that depression should enhance expansion of pathogenic Th22 cells.

It is believed that involvement of IL-1 β , IL-6, IL-22 and IL-17 in MS pathogenesis involve activation of local (astrocytes and microglia) and migrating (monocytes) accessory cells. These cells, can be activated by these cytokines, leading to a release of metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, thus disrupting the integrity of BBB, and a broad arsenal of neurotoxic and demyelinating mediators, such as free radicals derived from oxygen (Ortiz et al, 2013).

Beyond their involvement in MS activity, elevated levels of cytokines, such as IL-6 and IL-21, might compromise the function of regulatory CD4⁺ T (Treg) subsets in those patients (Astier et al, 2006; Haas et al, 2014; Viglietta et al, 2004). In addition to producing anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, the expression of CD25, CD39 and CD152 on Treg cells has been associated with their functionality (Arce-Sillas et al, 2016; Ocho-Repáraz and Kasper, 2017; Sacramento et al, 2018). A study by our group (Sacramento et al, 2018) has found a lower frequency of CD39⁺IL-10⁺FoxP3⁺ CD4 T cells in non-depressed RRMS patients when compared with healthy subjects. In the present study, in comparison with non-depressed MS patients, the occurrence of MDD reduced the IL-10 levels quantified in the plasma and in the supernatants collected from MBP-stimulated PBMC cultures. Further, the severity of depressive symptoms negatively correlated with IL-10 levels. A more detailed investigation of the impact of MDD on different regulatory CD39⁺ T cell subsets, demonstrated a higher frequency of CD39⁺ and CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells able to express FoxP3, IL-10 and CTLA-4 in non-depressed MS patients after mitogen activation. Furthermore, a lower percentage of CD39⁺ and CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells capable of expressing

CTLA-4 in response to MBP was observed in MS/MDD patients than in MS patients. With regard to disease activity, the proportion of myelin-specific CD39⁺CD25⁺CD4⁺ T cells inversely correlated with neurological disabilities. Also, the BDI score negatively correlated with the percentage of MBP-specific CD39⁺CTLA-4⁺ and CD39⁺CD25⁺CTLA-4⁺CD4⁺ T cells. Collectively, these findings reveal the negative impact of lifetime depression on auto-tolerance mechanisms in MS patients. Although we have performed a cross-sectional study, we are seeking to prospectively assess clinical parameters from those MS patients with and without MDD, such as the number of annualized clinical relapses, cognitive damage and cortical atrophy.

Excessive cytokine production may also contribute to MS pathogenesis by depleting tryptophan, an essential amino acid for the synthesis of serotonin (5-HT) (Badawy, 2013). It is known that MDD pathology is associated with a reduction in monoamine production, particularly 5-HT (Cowen and Browning, 2015), and that serotonergic neurotransmission is altered in the brain of MS patients (Hesse et al, 2014). Apart from its role as a CNS neurotransmitter, 5-HT, through its wide array of receptors (5-HT₁₋₇) and in a dose-dependent manner, carries out different actions on immune cells (Shajib and Khan, 2014).

In humans, 5-HT_{2B} receptor is expressed in monocyte-derived CD1a⁺DC, and signaling through this receptor reduced the production of IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α by these cells activated via pattern receptors TLR2, TLR3 and TLR7/8 (Szabo et al, 2018). Moreover, Muller et al. (2009) demonstrated that 5-HT₄ receptor agonists decreased IFN- γ production, but increased IL-10 and IL-6 release by mononuclear cells from healthy subjects. Snir et al. (2013) showed that 5-HT_{2A} agonist reduced TNF- α production by LPS-activated mononuclear cells. Also, Chabbi-Achengli et al. (2016), using an experimental rheumatoid arthritis model, demonstrated the ability of serotonin, via the 5-HT_{2A} receptor, to reduce the severity of collagen-induced arthritis in mice. In these animals, serotonin, as well as 5-HT_{2A} receptor agonists, diminished the frequency of type II collagen-specific-Th17 cells. Concerning Tregs cells, Kim et al. (2012) demonstrated that individuals with serious

depression have a lower frequency of circulating classical Treg cells. Additionally, when compared with healthy individuals, CD39⁺ Treg cells expressed lower 5-HT_{1A} receptor levels (Kim et al, 2012). Although we did not investigate the involvement of 5-HT receptors, serotonin reduced the *in vitro* release of Th1/Th17-like cytokines after mitogen or myelin antigen stimulation. Nonetheless, this neurotransmitter only elevated IL-10 production in polyclonally-activated T cells. In general, in all experiments, the production of this anti-inflammatory cytokine in response to myelin antigen was very low and variable in MS patients, indicating lower ability of myelin-specific T cells to produce IL-10. Altogether, these findings suggest that MDD treatment with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) could play an adjuvant role in the treatment of MS. Under-diagnosed by physicians and, therefore, undertreated, MDD in MS patients is also the strongest determinant of impaired quality of life, sleep disturbance, fatigue and cognitive dysfunction (Palé et al, 2017). In this sense, a recent study published by our group demonstrated the ability of SSRI therapy in decreasing *in vivo* the frequency of pathogenic TLR⁺ Th17-like cells, as well as their *in vitro* responsiveness to TLR2 and TLR4 ligands (Sales et al, 2021).

Although the study has some weaknesses, such as the small sample size and the need for a prospective study, the findings presented here reveal the negative impact of lifetime depression on the imbalance of T cell-derived cytokines implicated in the MS pathogenesis, with expansion of Th1/Th17 and Th22 cell subsets in detriment of reducing the frequency of CD39⁺ Tregs cell subsets, mainly those expressing CTLA-4 marker. Finally, the ability of serotonin to attenuate the production of cytokines by effector T cells suggests that lower availability of this neurotransmitter in patients with MDD may contribute to MS severity.

Acknowledgements: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ, grant number: E-26/202.940/2017) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number: 301.780/2017-0).

References

- Angelou, C.C., Wells, A.C., Vijayaraghavan, J., Dougan, C.E., Lawlor, R., Iverson, E., Lazarevic, V., Kimura, M.Y., Peyton, S.R., Minter, L.M., Osborne, B.A., Pobezinskaya, E.L., Pobezinsky, L.A., 2020. Differentiation of Pathogenic Th17 Cells Is Negatively Regulated by Let-7 MicroRNAs in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* 10, 3125. doi: 10.3389/fimmu.2019.03125.
- Arce-Sillas, A., Álvarez-Luquín, D.D., Tamaya-Domínguez, B., Gomez-Fuentes, S., Trejo-García, A., Melo-Salas, M., Cárdenas, G., Rodríguez-Ramírez, J., Adalid-Peralta, L., 2016. Regulatory T Cells: Molecular Actions on Effector Cells in Immune Regulation. *J. Immunol. Res.* 2016, 1720827. doi: 10.1155/2016/1720827.
- Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Velasco-Velázquez, M.A., Garcés-Alvarez, M.E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabian, S., Pavón, L., 2015. Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin. *J. Immunol. Res.* 2015, 1–21. doi: 10.1155/2015/354957.
- Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., Hafler, D.A., 2006. Alterations in CD46⁺ mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 116(12), 3252–3257. doi: 10.1172/JCI29251.
- Bachmann, M.F., Oxenius, A., 2007. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* 8(12), 1142–1148. doi: 10.1038/sj.embor.7401099.
- Badawy, A.A., 2013. Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *J. Psychopharmacol.* 27(10), 878–93. doi: 10.1177/0269881113499209.
- Benito-León, J., Morales, J.M., Rivera-Navarro, J., Mitchell, A., 2003. A review about the impact of multiple sclerosis on health-related quality of life. *Disabil. Rehabil.* 25(23), 1291–303. doi: 10.1080/09638280310001608591.

- Brucklacher-Waldert, V., Stuerner, K., Kolster, M., Wolthausen, J., Tolosa, E., 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132(Pt 12), 3329–3341. doi: 10.1093/brain/awp289.
- Bruno, R., Sabater, L., Sospedra, M., Ferrer-Francesch, X., Escudero, D., Martínez-Cáceres, E., Pujol-Borrell, R., 2002. Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus. *Eur. J. Immunol.* 32(10), 2737–47. doi: 10.1002/1521-4141(200210)32:10<2737::AID-IMMU2737>3.0.CO;2-0.
- Chabbi-Achengli, Y., Coman, T., Collet, C., Callebert, J., Corcelli, M., Lin, H., Rignault, R., Dy, M., de Vernejoul, M-C., Côté, F., 2016. Serotonin Is Involved in Autoimmune Arthritis through Th17 Immunity and Bone Resorption. *Am. J. Pathol.* 186(4), 927–37. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.018.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648), 1502–17. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Cowen, P.J., Browning, M., 2015. What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry* 14(2), 158–160. doi: 10.1002/wps.20229.
- Duhen, T., Campbell, D.J., 2014. IL-1 β promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6⁺CXCR3⁺ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. *J. Immunol.* 193(1), 120–9. doi: 10.4049/jimmunol.1302734.
- Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2009. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10(8), 857–63. doi: 10.1038/ni.1767.
- Fernstrom, J.D., Wurtman, R.J., 1973. Control of brain 5-HT content by dietary carbohydrates. In: Barchas J and Usdin E (Eds.), *Serotonin and Behavior*. Elsevier Inc. Philadelphia, USA, pp. 121–128.

- Ferreira, T.B., Hygino, J., Wing, A.C., Kasahara, T.M., Sacramento, P.M., Camargo, S., Rueda, F., Alves-Leon, S.V., Alvarenha, R., Vasconcelos, C.C., Agrawal, A., Gupta, S., Bento, C.A.M., 2017. Different interleukin-17-secreting Toll-like receptor⁺ T-cell subsets are associated with disease activity in multiple sclerosis. *Immunology* 154, 239–252. doi: 10.1111/imm.12872.
- Goldsmith, D.R., Rapaport, M.H., Miller, B.J., 2016. A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry* 21, 1696–1709. doi: 10.1038/mp.2016.3.
- Govindarajan, V., Vaccari, J.P.R., Keane, R.W., 2020. Role of inflammasomes in multiple sclerosis and their potential as therapeutic targets. *J Neuroinflammation* 17(1), 260. doi: 10.1186/s12974-020-01944-9.
- Haas, J., Schwarz, A., Korporal-Kunke, M., Jarius, S., Wiendl, H., Kieseier, B.C., Wildemann, B., 2014. Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 21(2), 1-12. doi: 10.1177/1352458514564589.
- Herr, N., Bode, C., Duerschmied, D., 2017. The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 4, 48. doi: 10.3389/fcvm.2017.00048.
- Hesse, S., Moeller, F., Petroff, D., Lobsien, D., Luthardt, J., Regenthal, R., Becker, G.A., Patt, M., Thomae, E., Seese, A., Meyer, P.M., Bergh, F.T., Sabri, O., 2014. Altered serotonin transporter availability in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 41(5), 827-35. doi: 10.1007/s00259-013-2636-z.
- Hiltensperger, M., Korn, T., 2018. The Interleukin (IL)-23/T helper (Th)17 Axis in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 8(1), a029637. doi:10.1101/cshperspect.a029637.

- Hind, D., Kaklamanou, D., Beever, D., Webster, R., Lee, E., Barkham, M., Cooper, C., 2016. The assessment of depression in people with multiple sclerosis: a systematic review of psychometric validation studies. *BMC Psychiatry* 16, 278. doi: 10.1186/s12888-016-0931-5.
- Keaton, S.A., Madaj, Z.B., Heilman, P., Smart, L., Grit, J., Gibbons, R., Postolache, T.T., Roaten, K., Achtyes, E.D., Brundin, L., 2019. An inflammatory profile linked to increased suicide risk. *J. Affect Disord.* 247, 57–65. doi: 10.1016/j.jad.2018.12.100.
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., Prat, A., 2009. Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 66, 390–402. doi: 10.1002/ana.21748.
- Kim, S., Lee, H., Lee, G., Oh, S., Shin, M., Shim, I., Bae, H., 2012. CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Depletion Modulates Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice. *PLoS One* 7(7), e42054. doi: 10.1371/journal.pone.0042054.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–52. doi: 10.1212/wnl.33.11.1444.
- Lécuyer, M.A., Kebir, H., Prat, A., 2016. Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochim. Biophys. Acta.* 1862(3), 472–82. doi: 10.1016/j.bbdis.2015.10.004.
- Li, Y-C., Chou, Y-C., Chen, H-C., Lu, C-C., Chang, D-M., 2019. Interleukin-6 and interleukin-17 are related to depression in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 22(6), 980-985. doi: 10.1111/1756-185X.13529.
- Lotfi, N., Thome, R., Rezaei, N., Zhang, G.X., Rezaei, A., Rostami, A., Esmaeil, N., 2019. Roles of GM-CSF in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases: An Update. *Front. Immunol.* 10, 1265. doi: 10.3389/fimmu.2019.01265.

- Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., Racke, M.K., 2011. Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1812(2), 246–251. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.05.012.
- M.S.I.F., 2013. Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World. Multiple Sclerosis International Federation. Available at: <https://www.msif.org/wp-content/uploads/2014/09/Atlas-of-MS.pdf>. Accessed June 1, 2020.
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Özenci, V., Fredrikson, S., Link, H., 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* 5, 101–104. doi: 10.1177/135245859900500206.
- Milo, R., Miller, A., 2014. Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews* 13, 518–524. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.012.
- Mohr, D.C., Hart, S.L., Julian, L., Cox, D., Pelletier, D., 2004. Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ*. 328(7442), 731-735. doi: 10.1136/bmj.38041.724421.55.
- Müller, T., Dürk, T., Blumenthal, B., Grimm, M., Cicko, S., Panther, E., Soritcher, S., Herouy, Y., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Norgauer, J., Idzko, M., 2009. 5-Hydroxytryptamine Modulates Migration, Cytokine and Chemokine Release and T-Cell Priming Capacity of Dendritic Cells In Vitro and In Vivo. *PLoS One* 4(7), e6453. doi: 10.1371/journal.pone.0006453.
- Ochoa-Repáraz, J., Kasper, L.H., 2017. The influence of gut-derived CD39 regulatory T cells in CNS demyelinating disease. *Transl. Res.* 179, 126-138. doi: 10.1016/j.trsl.2016.07.016.
- Ortiz, G.G., Pacheco-Moisés, F.P., Bitzer-Quintero, O.K., Ramírez-Anguiano, A.C., Flores-Alvarado, L.J., Ramírez-Ramírez, V., Macias-Islas, M.A., Torres-Sánchez, E.D., 2013. Immunology and Oxidative Stress in Multiple Sclerosis: Clinical and Basic Approach. *Clinical and Developmental Immunology* 2013, 1–14. doi: 10.1155/2013/708659.

- Palé, L.A., Caballero, J.L., Buxareu, B.S., Serrano, P.S., Solà, V.P., 2017. Systematic review of depression in patients with multiple sclerosis and its relationship to interferon β treatment. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 17, 138–143. doi: 10.1016/j.msard.2017.07.008.
- Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelyi, D., Dittel, B.N., 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 178(1), 39–48. doi: 10.4049/jimmunol.178.1.39.
- Rasouli, J., Ciric, B., Imitola, J., Gonnella, P., Hwang, D., Mahajan, K. Mari, E.R., Safavi, F., Leist, T.P., Zhang, G-X., Rostami, A., 2015. Expression of GM-CSF in T-cells is increased in multiple sclerosis and suppressed by IFN- β therapy. *J. Immunol.* 194, 5085–93. doi: 10.4049/jimmunol.1403243.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., Sallusto, F., 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.* 10(5), 514–23. doi: 10.1038/ni.1716.
- Restorick, S.M., Durant, L., Kalra, S., Hassan-Smith, G., Rathbone, E., Douglas, M.R., Curnow, S.J., 2017. CCR6⁺ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells. *Brain. Behav. Immun.* 64, 71–79. doi: 10.1016/j.bbi.2017.03.008.
- Robertson, D., Moreo, N., 2016. Disease-Modifying Therapies in Multiple Sclerosis: Overview and Treatment Considerations. *Fed. Pract.* 33, 28–34.
- Rolla, S., Bardina, V., De Mercanti, S., Quaglino, P., De Palma, R., Gned, D., Brusa, D., Durelli, L., Novelli, F., Clerico, M., 2014. Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN- β . *J. Leukoc. Biol.* 96, 1–10. doi: 10.1189/jlb.5A0813-463RR.

- Rossi, S., Studer, V., Motta, C., Germani, G., Macchiarulo, G., Buttari, F., Mancino, R., Castelli, M., De Chiara, V., Weiss, S., Martino, G., Furlan, R., Centonze, D., 2014. Cerebrospinal fluid detection of interleukin-1 β in phase of remission predicts disease progression in multiple sclerosis. *J. Neuroinflammation* 11, 32. doi: 10.1186/1742-2094-11-32.
- Rudick, R., Cohen, J., Weinstock-Guttman, B., Kinkel, R., Ransohoff, R., 1997. Management of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 337,1604–11. doi: 10.1056/NEJM199711273372207.
- Sacramento, P.M., Monteiro, C., Dias, A.S.O., Kasahara, T.M., Ferreira, T.B., Hygino, J., Wing, A.C., Andrade, R.M., Rueda, F., Sales, M.C., Vasconcelos, C.C., Bento, C.A.M., 2018. Serotonin decreases the production of Th1/Th17 cytokines and elevates the frequency of regulatory CD4⁺ T-cell subsets in multiple sclerosis patients. *Eur. J. Immunol.* 48(8), 1376-1388. doi: 10.1002/eji.201847525.
- Sales, M.C., Kasahara, T.M., Sacramento, P.M., Rossi, A.D., Cafasso M.O.S.D., Oyamada, H.A.A., Hygino, J., Alvim, F., Andrade, R.M., Vasconcelos, C.C., Bento, C.A.M., 2021. Selective serotonin reuptake inhibitor attenuates the hyperresponsiveness of TLR2⁺ and TLR4⁺ Th17/Tc17-like cells in multiple sclerosis patients with major depression. *Immunology* 162(3), 290-305. doi: 10.1111/imm.13281.
- Sambamoorthi, U., Shah, D., Zhao, X., 2017. Healthcare burden of depression in adults with arthritis. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 17(1), 53–65. doi: 10.1080/14737167.2017.1281744.
- Schumacher, G.A., Beebe, G., Kibler, R.F., Kurland, L.T., Kurtzke, J.F., McDowell, F., nagler, B., Sibley, W.A., Tourtellotte, W.W., Willmon, T.L., 1965. Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on the evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 122, 552–568. doi: 10.1111/j.1749-6632.1965.tb20235.x.

- Shajib, M.S., Khan, W.I., 2014. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol. (Oxf)*. 213(3), 561–574. doi: 10.1111/apha.12430.
- Shi, Y., Chen, Z., Zhao, Z., Yu, Y., Fan, H., Xu, X., Bu, X., Gu, J., 2019. IL-21 Induces an Imbalance of Th17/Treg Cells in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis Patients. *Front. Immunol.* 10, 1865. doi: 10.3389/fimmu.2019.01865.
- Siegert, R.J., Abernethy, D.A., 2005. Depression in multiple sclerosis: a review. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 469–75. doi: 10.1136/jnnp.2004.054635.
- Snir, O., Hesselberg, E., Amoudruz, P., Klareskog, L., Zarea-Ganji, I., Catrina, A.L., Padykow, L., Malmström, V., Seddighzadeh, M., 2013. Genetic variation in the serotonin receptor gene affects immune responses in rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity* 14, 83–89. doi: 10.1038/gene.2012.56.
- Soga, F., Katoh, N., Inoue, T., Kishimoto, S., 2007. Serotonin Activates Human Monocytes and Prevents Apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology* 127, 1947–1955. doi: 10.1038/sj.jid.5700824.
- Szabo, A., Gogolak, P., Koncz, G., Foldvari, Z., Pazmandi, K., Miltner, N., Poliska, S., Bacsí, A., Djurovic, S., Rajnavolgyi, E., 2018. Immunomodulatory capacity of the serotonin receptor 5-HT2B in a subset of human dendritic cells. *Scientific Reports* 8(1), 1765. doi: 10.1038/s41598-018-20173-y.
- Ting, E.Y-C., Yang, A.C., Tsai, S-J., 2020. Role of Interleukin-6 in Depressive Disorder. *Int. J. Mol. Sci.* 21(6), 2194. doi: 10.3390/ijms21062194.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., Fugger, L., 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172(1), 146–55. doi: 10.2353/ajpath.2008.070690.

- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 199(7), 971–979. doi: 10.1084/jem.20031579.
- Vos, T., Abajobir, A.A., Abate, K.H., Abbafati, C., Abbas, K.M., Abd-Allah, F., et al., 2017. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390(10100), 1211–59. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2.
- Wing, A.C., Hygino, J., Ferreira, T.B., Kasahara, M., Barros, P.O., Sacramento, P.M., Andrade, R.M., Camargo, S., Rueda, F., Alves-Leon, S., Vasconcelos, C.C., Alvarenga, R., Bento, C.A.M., 2016. Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4⁺ T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology* 147(2), 212–20. doi: 10.1111/imm.12552.
- Zhong, W., Jiang, Y., Ma, H., Wu, J., Jiang, Z., Zhao, L., 2017. Elevated levels of CCR6⁺ T helper 22 cells correlate with skin and renal impairment in systemic lupus erythematosus. *Sci. Rep.* 7(1), 12962. doi: 10.1038/s41598-017-13344-w.
- Zou, W., Feng, R., Yang, Y., 2018. Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. Hashimoto K, editor. *PLoS One* 13, e0197267. doi: 10.1371/journal.pone.0197267.

Table 1. Demographic and clinical features of MS patients.

	Patients	
	MS ^a	MS/MDD ^b
N° of subjects (n)	30	30
Gender, female/male (n)	18/12	20/10
Age [(years), mean $\pm$ SD]	36.3 $\pm$ 11.8	35.8 $\pm$ 10.7
Disease duration [(years), mean $\pm$ SD]	6.5 $\pm$ 5.9	7.1 $\pm$ 6.1
BDI ^c (mean $\pm$ SD)	5.0 $\pm$ 2.8	22.7 $\pm$ 8.1
EDSS ^d [median (range)]	1.5 (0-7)	2.5 (0-6)
Treatment with DMT ^e [n (%)]	20 (67)	23 (77)

Data from relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) ^awithout (MS) or ^bwith (MS/MDD) major depressive disorder (MDD) in clinical remission phase. Age (years) refers to age when the blood samples and clinical information were collected. Disease duration refers to the number of years since disease onset. ^cBDI, Beck depression inventory (BDI). ^dEDSS, expanded disability status scale and ^e DMT, disease-modifying therapy.

Table 2. Correlation between the levels of plasma cytokines with neurological disabilities and severity of depressive symptoms.

Cytokines (pg/mL)	MS patients			
	EDSS ¹		BDI ²	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>IL-1β</i>	0.5192	0.0023	0.5604	0.0008
<i>IL-6</i>	0.443	0.0111	0.377	0.334
<i>IL-23</i>	0.4401	0.0117	0.2429	0.1804
<i>IL-12</i>	0.7784	<0.0001	0.2121	0.3539
<i>TNF-α</i>	0.5115	0.0028	0.0105	0.9542
<i>IL-17</i>	0.5874	0.0004	0.3929	0.0261
<i>IL-22</i>	0.2918	0.1052	0.2486	0.1701
<i>IL-10</i>	-0.2533	0.1619	-0.7089	<0.0001

The levels of circulating cytokines were determined by Luminex.

¹EDSS, expanded disability status scale and ²BDI, Beck depression inventory (BDI)

Table 3. Correlation between *in vitro* cytokine production and clinical parameters in MS patients.

Cytokine (pg/mL)	MS patients			
	EDSS		BDI	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>αCD3/CD28</i>				
<i>IL-6</i>	0.2146	0.2089	0.6105	<0.0001
<i>IL-10</i>	-0.3109	0.0611	-0.5211	0.0009
<i>IL-17</i>	0.5573	0.0003	0.3493	0.0341
<i>IL-21</i>	0.2863	0.0858	-0.2323	0.1666
<i>IL-22</i>	0.037	0.542	-0.0296	0.9131
<i>TNF-α</i>	0.2122	0.2074	0.1937	0.2507
<i>IFN-γ</i>	-0.087	0.6086	-0.7147	<0.0001
<i>GM-CSF</i>	0.4448	0.0058	0.1564	0.3553
<i>MBP + IL-2</i>				
<i>IL-6</i>	0.3298	0.0568	0.5197	0.0016
<i>IL-10</i>	-0.1744	0.3239	-0.5847	0.0003
<i>IL-17</i>	0.1573	0.3821	0.3647	0.0369
<i>IL-21</i>	0.1147	0.5183	0.5120	0.002
<i>IL-22</i>	0.3027	0.0818	0.5458	0.0008
<i>GM-CSF</i>	0.3313	0.0556	0.7892	<0.0001
<i>IFN-γ</i>	0.1858	0.3257	-0.5038	0.0045

The levels of cytokine released by anti-CD3/anti-CD28-activated and myelin antigen-stimulated PBMC cultures were determined by Luminex. ¹EDSS, expanded disability status scale and ²BDI, Beck depression inventory (BDI).

Table 4. The correlation between cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells with severity of neurological disabilities and depressive symptoms.

Cytokine expression (%)	<i>αCD3/CD28</i>				<i>MBP/IL-2</i>			
	EDSS		BDI		EDSS		BDI	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>CD4⁺ T cells</i>								
<i>IL-17⁺</i>	-0.1832	0.4781	-0.027	0.9189	0.3415	0.2321	-0.207	0.4745
<i>IFN-γ⁺</i>	0.1979	0.4588	0.2209	0.4081	0.1246	0.6424	-0.4321	0.0647
<i>GM-CSF⁺</i>	-0.1457	0.6322	-0.0219	0.9493	-0.1862	0.5239	0.0285	0.9276
<i>IL-22⁺</i>	-0.045	0.8734	-0.1737	0.5331	-0.3825	0.1297	-0.4295	0.1262
<i>CD8⁺ T cells</i>								
<i>IL-17⁺</i>	-0.2119	0.4109	0.1314	0.6130	0.597	0.0211	-0.0088	0.9750
<i>IFN-γ⁺</i>	0.0329	0.9042	0.0427	0.8757	0.4875	0.0293	-0.2474	0.3529
<i>GM-CSF⁺</i>	-0.1075	0.7266	-0.2795	0.3551	0.2369	0.4112	-0.1385	0.6375
<i>IL-22⁺</i>	-0.136	0.6290	-0.188	0.4994	-0.3337	0.2437	-0.3987	0.1580

The frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positives for IL-17, IFN-γ, GM-CSF and IL-22 was determined by flow cytometry after PBMC cell cultures activation with anti-CD3/anti-CD28 beads (*α*CD3/CD28) or MBP/IL-2. ¹EDSS, expanded disability status scale and ²BDI, Beck depression inventory (BDI).

Table 5. The correlation between the frequency of multi-cytokine-producing CD4⁺ and CD8⁺ T cells with clinical parameters of MS patients.

Cytokine expression (%)	<i>αCD3/CD28</i>				<i>MBP/IL-2</i>			
	EDSS		BDI		EDSS		BDI	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
<i>IL-17⁺CD4⁺ T cells</i>								
<i>IFN-γ⁺</i>	0.0548	0.8462	0.0331	0.9001	0.4771	0.0301	-0.0523	0.8464
<i>GM-CSF⁺</i>	0.3151	0.2377	0.1293	0.6724	0.4007	0.0522	0.0002	0.9999
<i>IL-22⁺</i>	0.0568	0.8578	-0.3259	0.2344	-0.3001	0.3409	-0.2007	0.4876
<i>IFN-γ⁺CD4⁺ T cells</i>								
<i>IL-22⁺</i>	0.3245	0.2773	-0.0224	0.9372	-0.1461	0.6527	-0.1982	0.4939
<i>GM-CSF⁺</i>	0.4087	0.2110	0.1813	0.5537	0.7244	0.0121	-0.0442	0.8807

The frequency of IL-17⁺CD4⁺ capable of producing IFN-γ, GM-CSF or IL-22, as well as IFN-γ⁺CD4⁺ T cells positives for GM-CSF or IL-22 was determined by flow cytometry after PBMC cell cultures activation with anti-CD3/anti-CD28 beads (αCD3/CD28) or MBP/IL-2. ¹EDSS, expanded disability status scale and ²BDI, Beck depression inventory (BDI).

Table 6. Correlation between different regulatory CD4⁺ T cell subsets and clinical parameters.

Expression (%)	<i>α</i> CD3/CD28				MBP/IL-2			
	EDSS		BDI		EDSS		BDI	
	r	p	r	p	r	p	r	p
<i>CD39⁺CD4⁺ T cells</i>	-0.418 7	0.0944	0.0953	0.7133	-0.3938	0.1628	-0.0804	0.7825
<i>CTLA-4⁺IL-10⁻</i>	0.0684	0.8086	-0.533	0.0187	-0.1605	0.5798	-0.5176	0.0603
<i>CTLA-4⁺IL-10⁺</i>	-0.2696	0.3278	-0.2316	0.4034	0.1627	0.5176	-0.0374	0.8988
<i>CD39⁺CD25⁺CD4⁺ T cells</i>	-0.3974	0.1274	0.1939	0.4858	-0.6579	0.0129	0.033	0.9124
<i>CTLA-4⁺IL-10⁻</i>	-0.2013	0.4720	-0.5297	0.0238	-0.0361	0.9038	-0.5624	0.0151
<i>CTLA-4⁺IL-10⁺</i>	-0.2095	0.4497	-0.1436	0.6074	0.0091	0.9765	0.0601	0.8369

The percentage of different CD39⁺Treg cells was determined by flow cytometry after PBMC cell cultures activation with anti-CD3/anti-CD28 beads (*α*CD3/CD28) or MBP/IL-2. ¹EDSS, expanded disability status scale and ²BDI, Beck depression inventory (BDI).

Figure

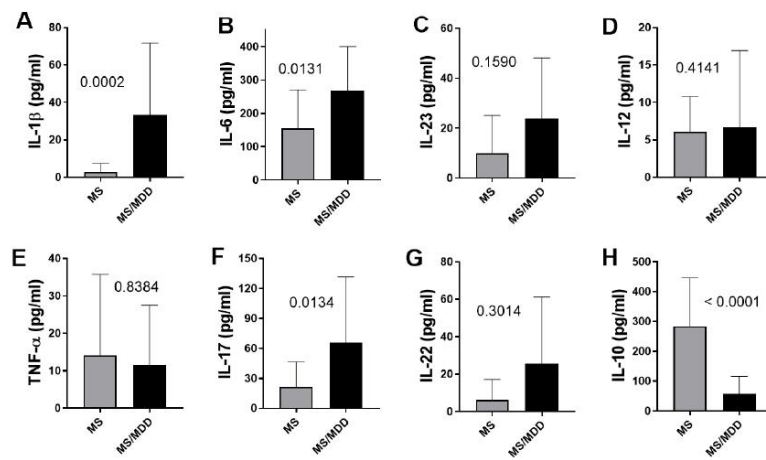
[Click here to access/download;Figure;figuras.docx](#)

Figure 1. Impact of MDD on circulating levels of cytokines in patients with MS. The levels of (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-23, (D) IL-12, (E) TNF- α , (F) IL-17, (G) IL-22, and (H) IL-10 were quantified in the plasma of MS patients with (MS/MDD) or without MDD (MS) major depression by Luminex. Significance was calculated by comparing MS versus MS/MDD and the *p* values indicated in the figure.

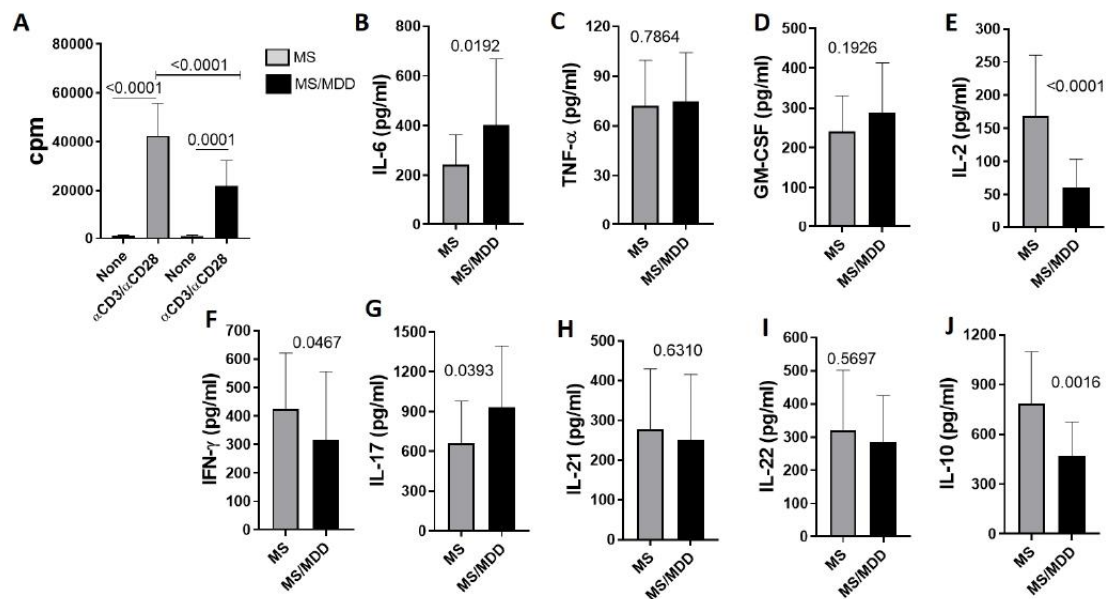


Figure 2. The *in vitro* T cell proliferation and cytokine production in depressed MS patients in response to polyclonal activation. PBMC cultures ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from MS patients without (MS) or with (MS/MDD) MDD were stimulated for 3 days with anti-CD3/anti-CD28 beads. In (A), the T cell proliferation was determined by [^3H] TdR uptake, and (B to J) the cytokine content evaluated by Luminex. Significance was calculated by comparing MS versus MS/MDD and the *p* values indicated in the figure.

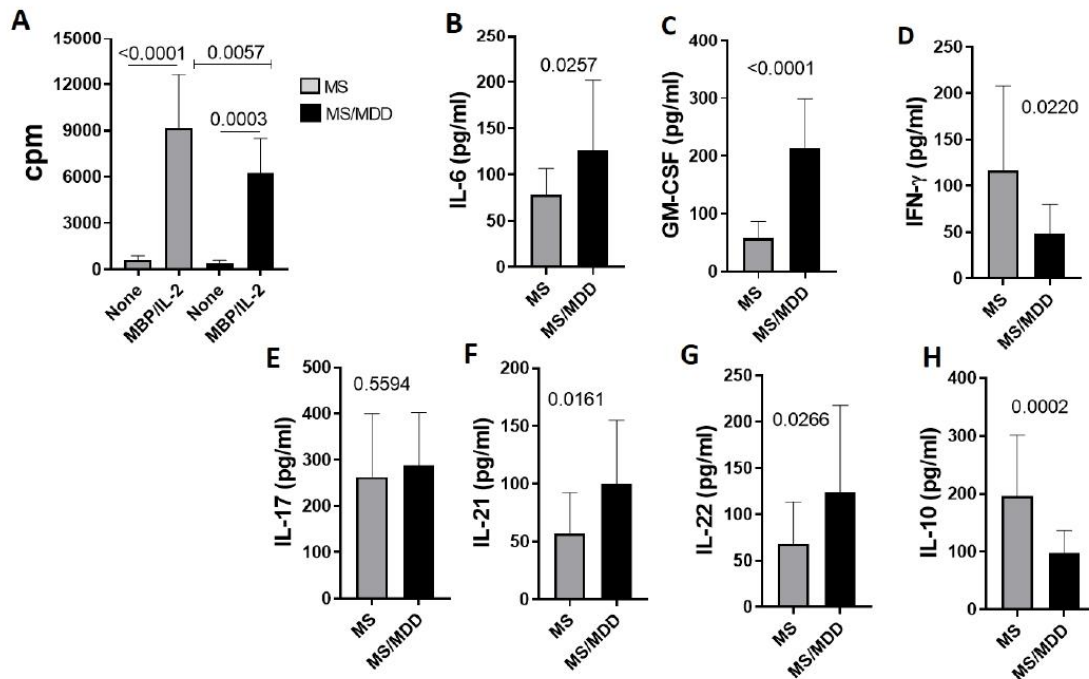
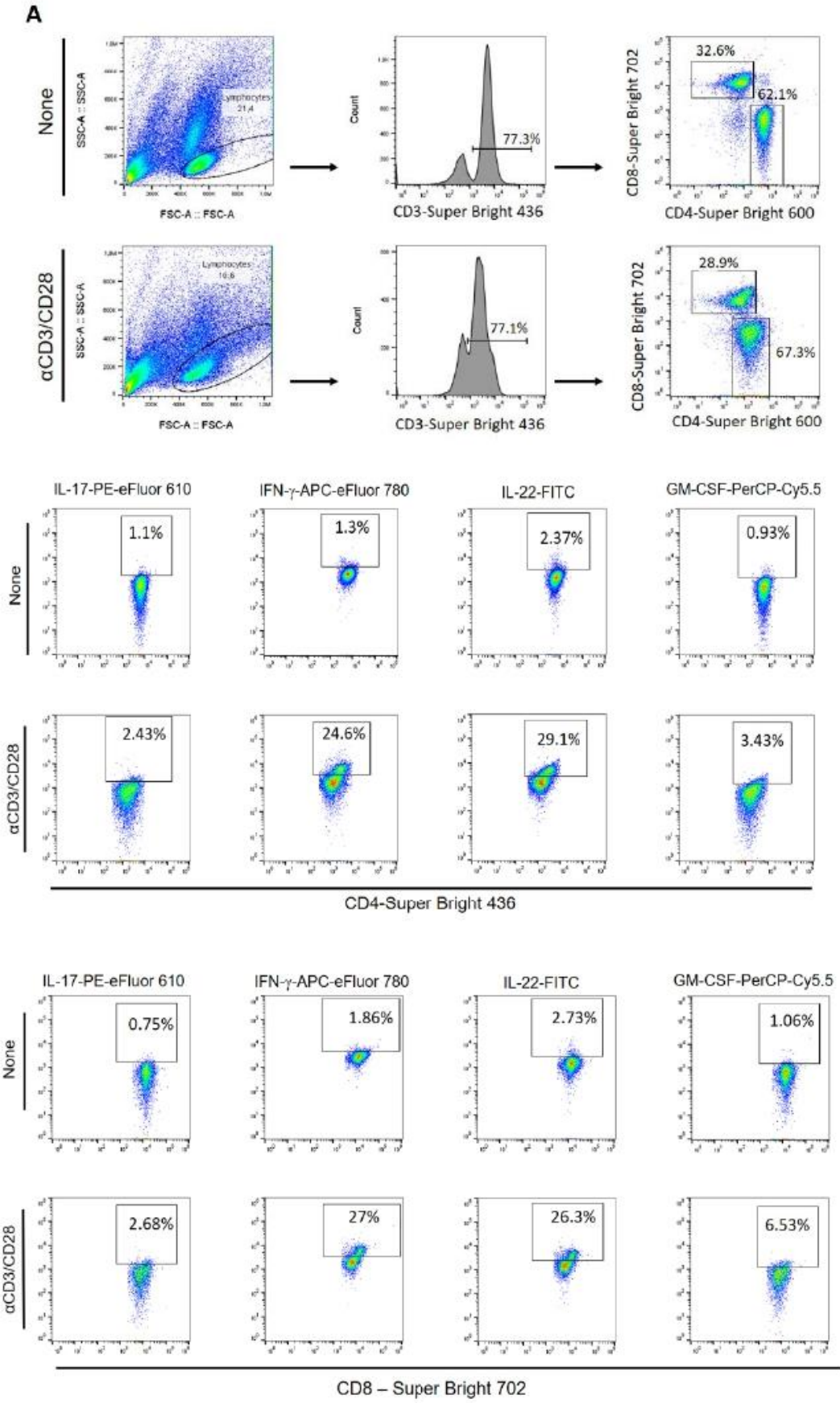


Figure 3. The impact of major depression on MS-derived PBMC proliferation and cytokine production in response to myelin antigen. ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from MS patients without (MS) or with (MS/MDD) were stimulated for 5 days with MBP/IL-2. In (A), the T cell proliferation was determined by [^3H] TdR uptake, and (B to H) the cytokines content evaluated by Luminex. Significance was calculated by comparing MS and MS/MDD (p values indicated in the figure).



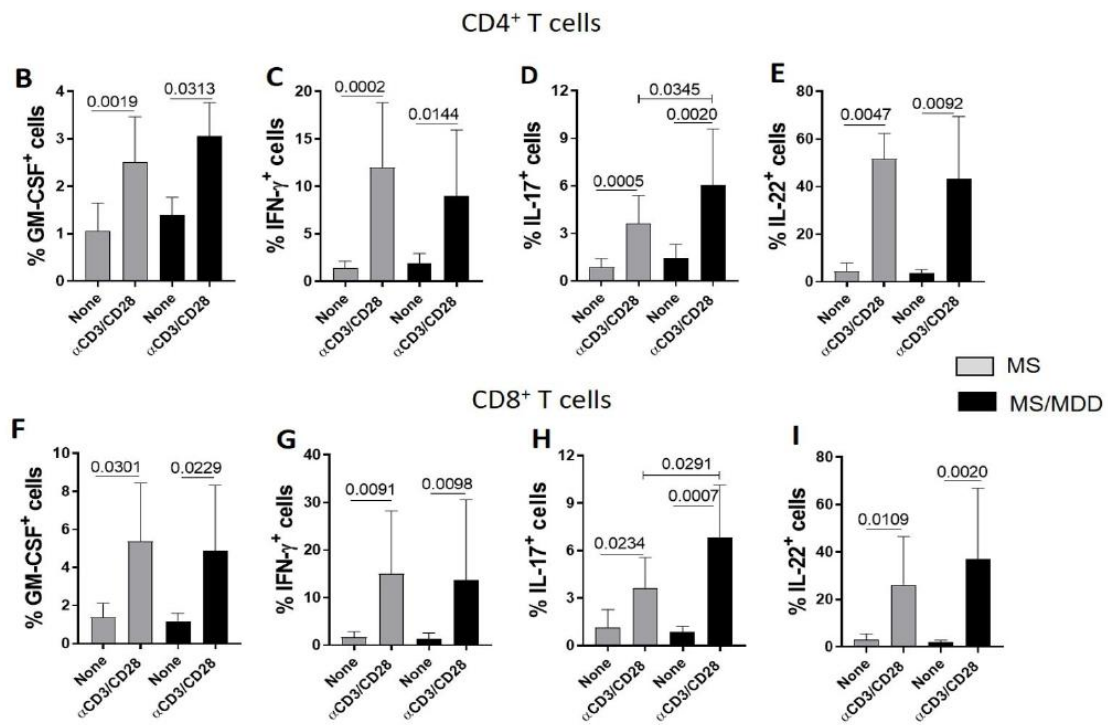
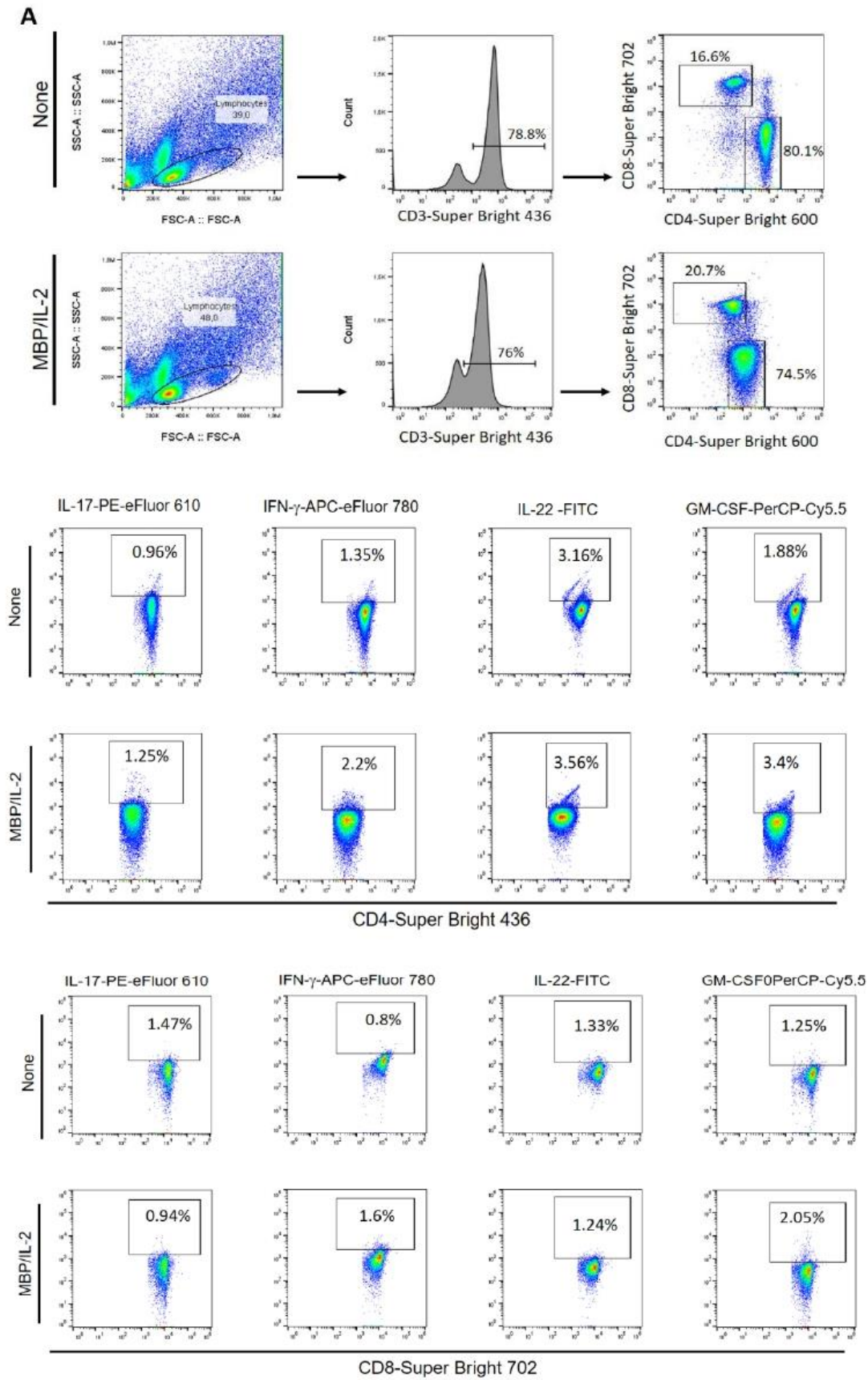


Figure 4. Comparison of the proportion of polyclonally-activated cytokine-secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells in MS patients with or without MDD. Taking into account the gating strategy shown in figure A, the mean proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positive for (B) GM-CSF, (C) IFN-γ, (D) IL-17 and (E) IL-22 in anti-CD3/anti-CD28-activated PBMC (1×10^6 /mL) cultures from depressed (MS/MDD) and non-depressed (MS) patients were compared (*p* values indicated in the figure).



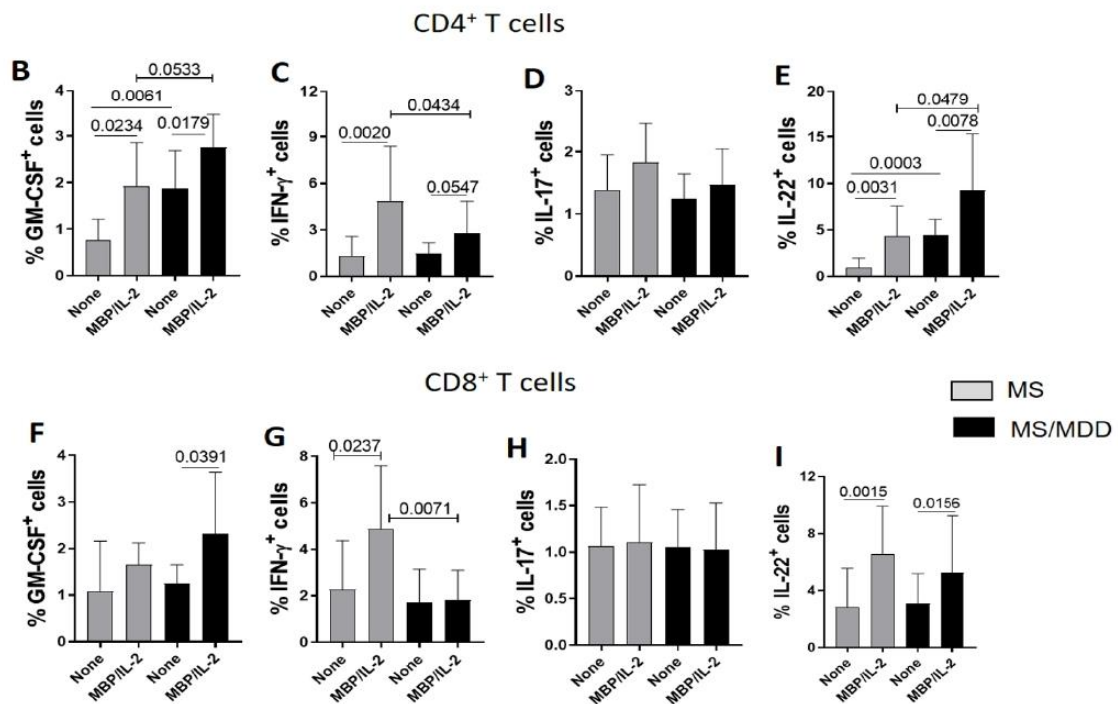


Figure 5. Influence of major depression on the proportion of myelin-specific T cells in MS patients. Applying the gating strategy shown in figure A, the mean proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells positive for (B) GM-CSF, (C) IFN- γ , (D) IL-17 and (E) IL-22 in PBMC (1×10^6 /mL) cultures from depressed (MS/MDD) and non-depressed (MS) patients after MBP/IL-2 addition ($10 \mu\text{g/mL}$). Significance was calculated by comparing MS and MS/MDD patients (p values indicated in the figure).

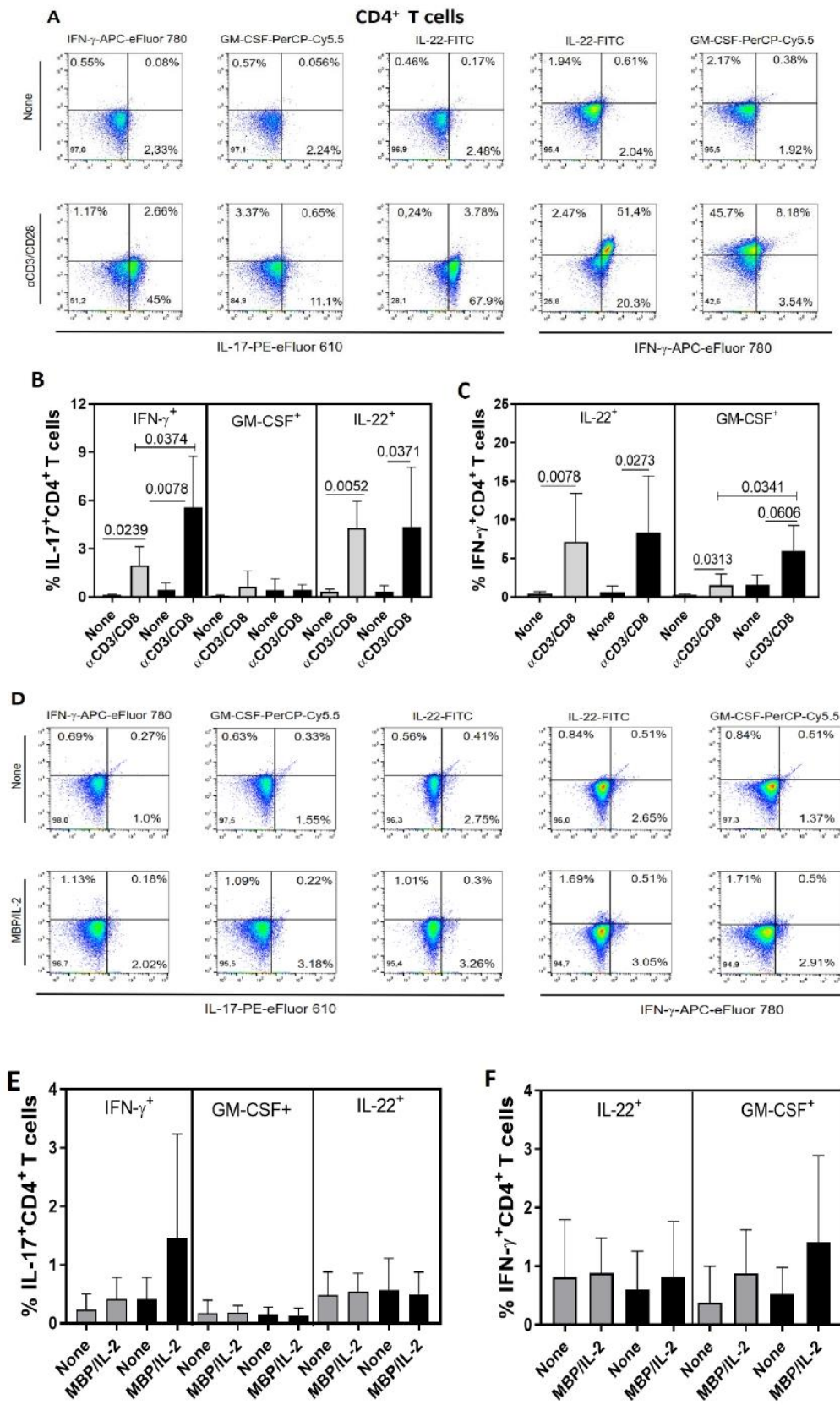
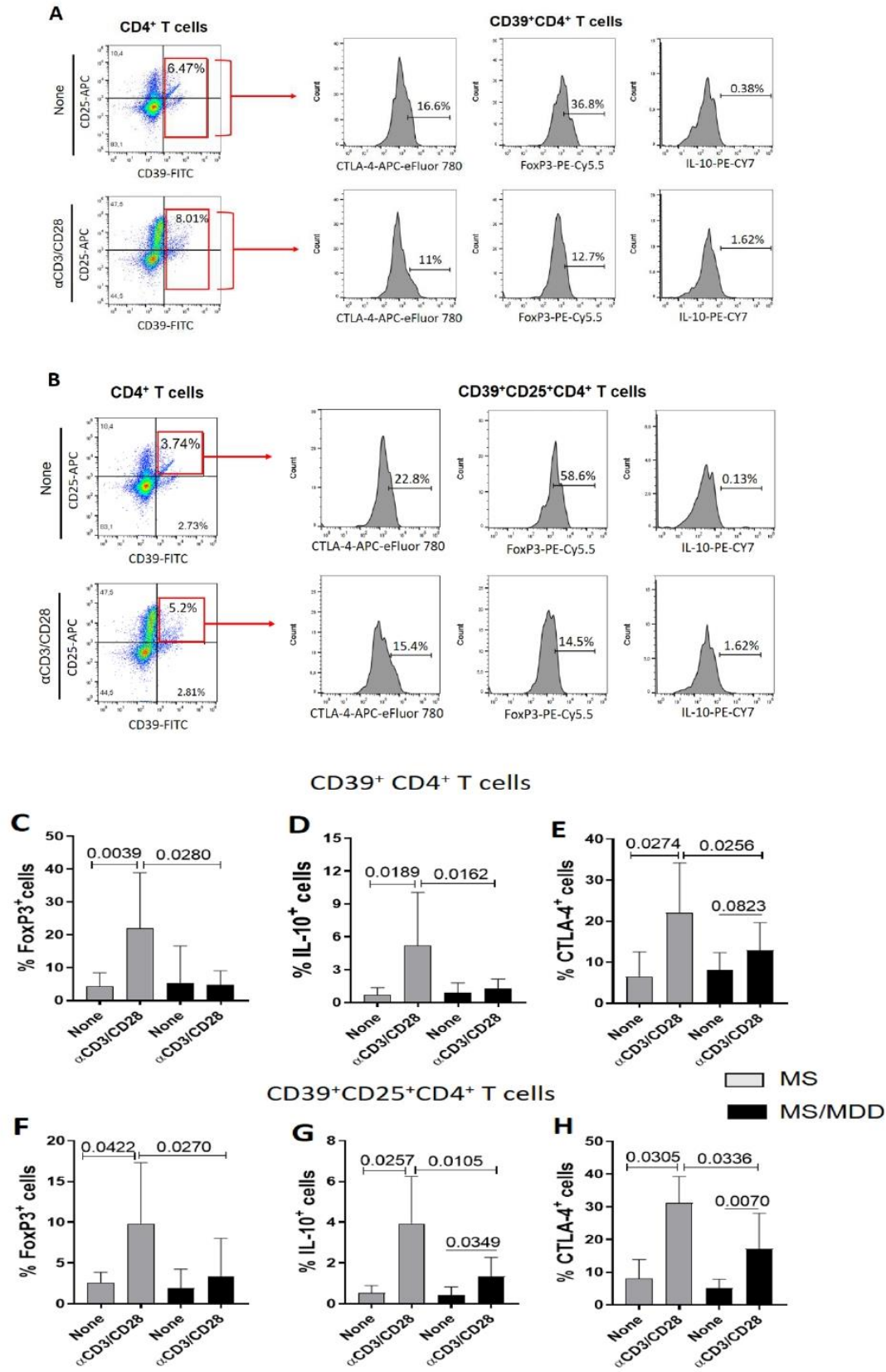


Figure 6. The impact of major depression on the frequency of multi-cytokine-secreting CD4⁺ T cells from MS patients. PBMC (1×10^6 /mL), from depressed (MS/MDD) and non-depressed (MS) patients, were cultured for 3 days in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads (A to C) or

for 5 days with MPB/IL-2 (**D** to **F**). After acquisition of 250,000 events, and following the gating strategy shown in figures **A** and **D**, the mean percentage of mitogen- and myelin-stimulated CD4⁺ T cell subsets dual positive for (B and E) IL-17⁺INF- γ ⁺, IL-17⁺GM-CSF⁺ and IL-17⁺IL-22⁺ or for (C and F) IFN- γ ⁺IL-22⁺ and IFN- γ ⁺GM-CSF⁺ was determined. Significance was calculated by comparing MS versus MS/MDD (*p* values indicated in the figure).



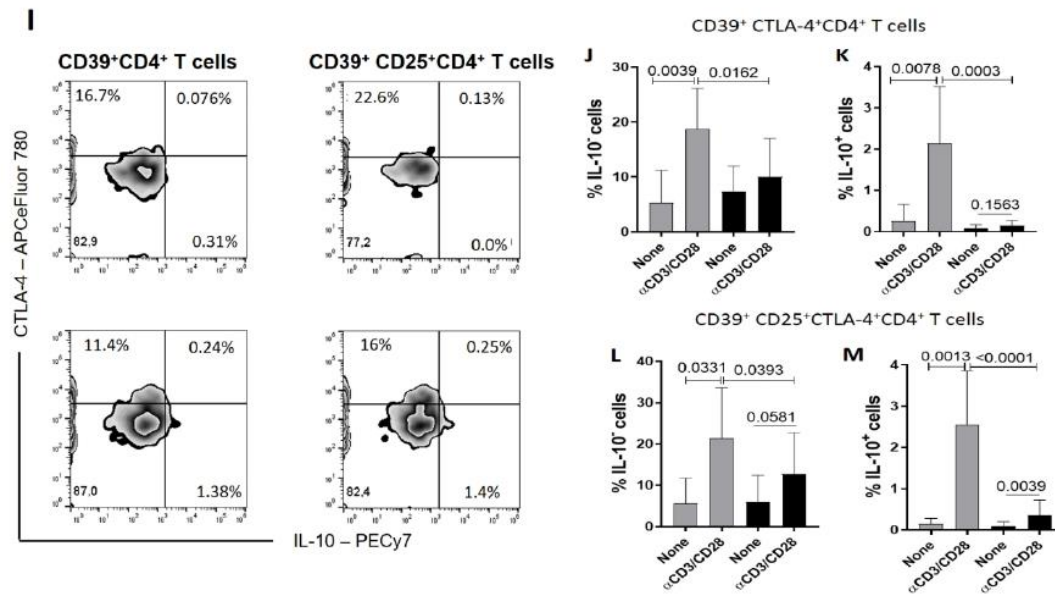


Figure 7. The *in vitro* frequency of different mitogen-activated CD39⁺Treg cells in depressed MS patients. PBMC (1×10^6 /mL), from depressed (MS/MDD) and non-depressed (MS) patients, were cultured for 3 days in the presence of anti-CD3/anti-CD28 beads. Different CD39⁺ Treg cell subsets capable of expression of CD25, FoxP3, CTLA-4 and IL-10 were determined by flow cytometry after acquisition of 250,000 events and following the gating strategies shown in figures A, B and I. The mean percentage of mitogen-stimulated CD39⁺ CD4⁺ T cell subsets able to co-express (C) FoxP3, (D) IL-10 or (E) CTLA-4, as well as CD39⁺ CD25⁺ CD4⁺ T cells positive for (F) FoxP3, (G) IL-10 or (H) CTLA-4 in the two subgroups of patients, were compared, and the *p* values indicated in the figure. The mean percentage of CTLA-4⁺CD39⁺ and CTLA-4⁺CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells negative (J and L) or positive (J and M) for IL-10 was also determined in MS and MS/MDD patients and compared (*p* values indicated in the figures).

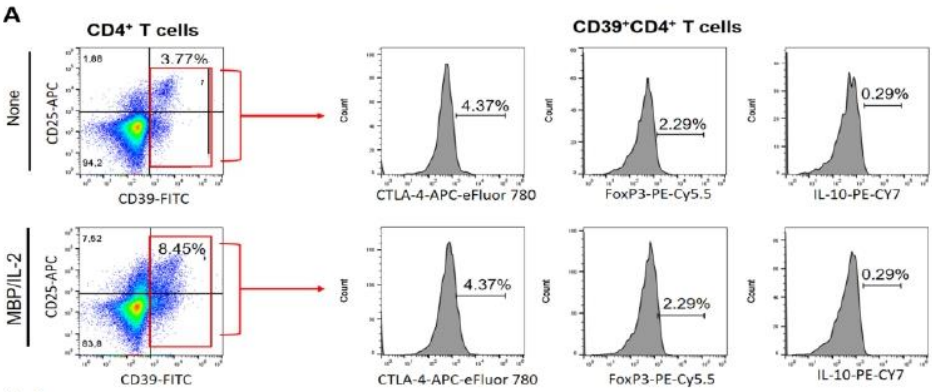
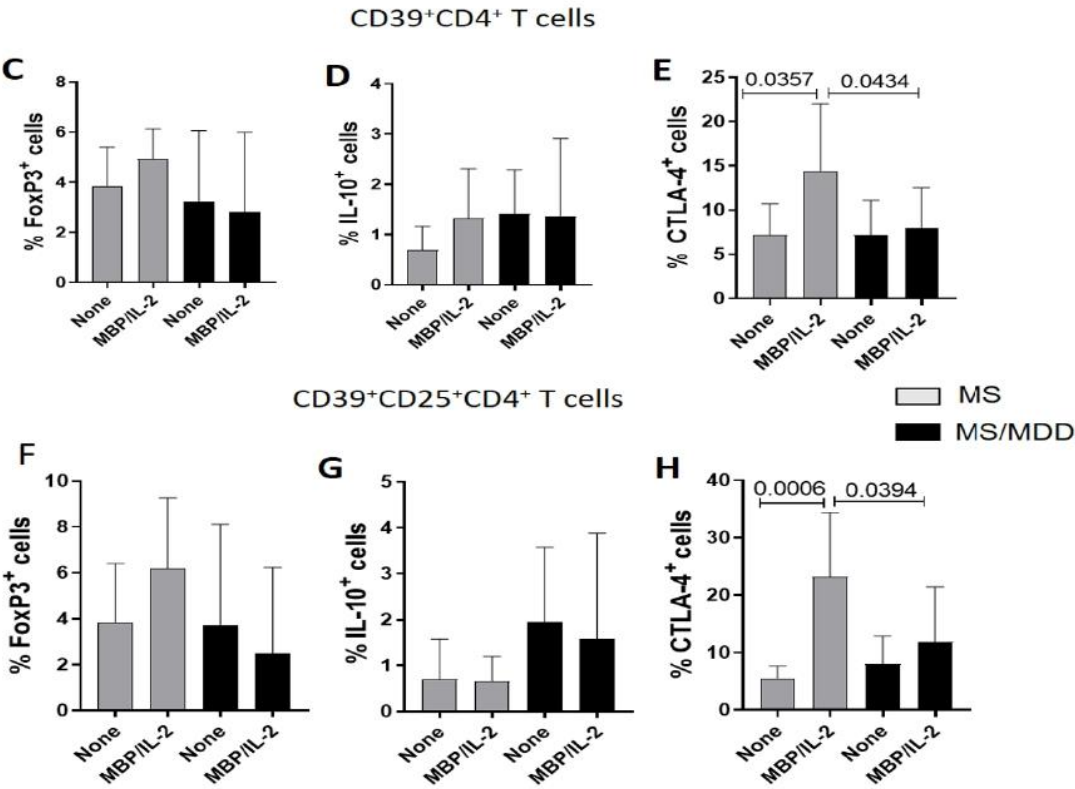
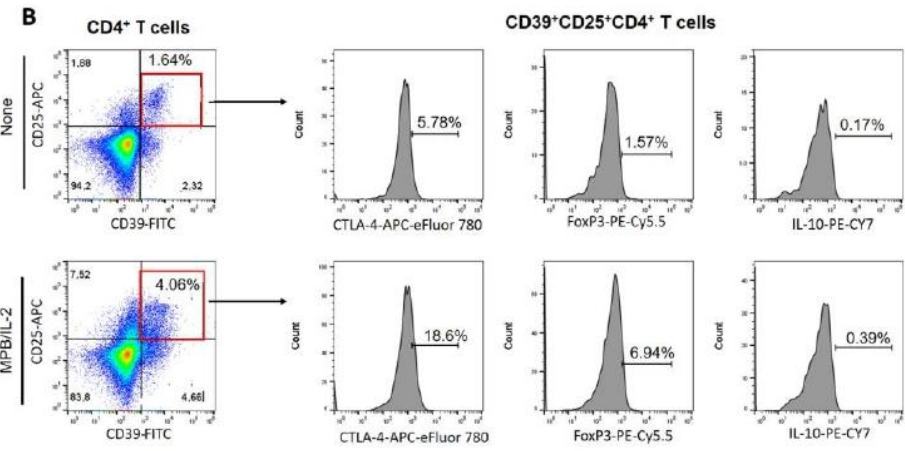


Fig. 8



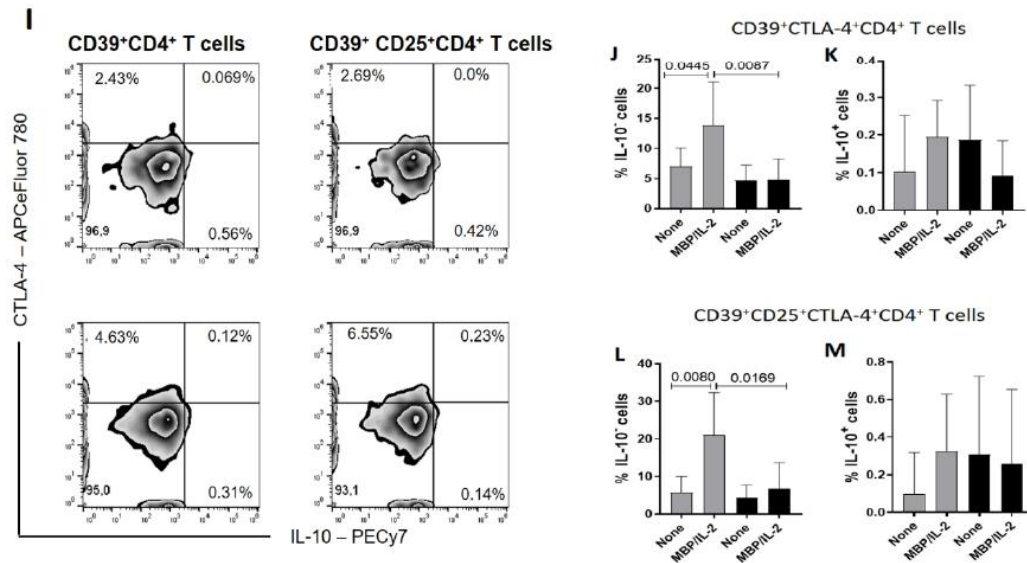


Figure 8. The frequency of different myelin-specific CD39⁺Treg cells in depressed MS patients. PBMC ($1 \times 10^6/\text{mL}$), from depressed (MS/MDD) and non-depressed (MS) patients, were cultured for 5 days in the presence of MBP/IL-2. Different CD39⁺ Treg cell subsets capable of expression of CD25, FoxP3, CTLA-4 and IL-10 was determined by flow cytometry after the acquisition of 250,000 events and following the gating strategies shown in figures A, B and I. The mean percentage of mitogen-stimulated CD39⁺ CD4⁺ T cell subsets able to co-express (C) FoxP3, (D) IL-10 or (E) CTLA-4, as well as CD39⁺ CD25⁺ CD4⁺ T cells positive for (F) FoxP3, (G) IL-10 or (H) CTLA-4 in the two patient subgroups were compared and the *p* values indicated in the figure. The mean percentage of CTLA-4⁺CD39⁺ and CTLA-4⁺CD39⁺CD25⁺ CD4⁺ T cells negative (J and L) or positive (J and M) for IL-10 was also determined in MS and MS/MDD patients and was compared (*p* values indicated in the figures).

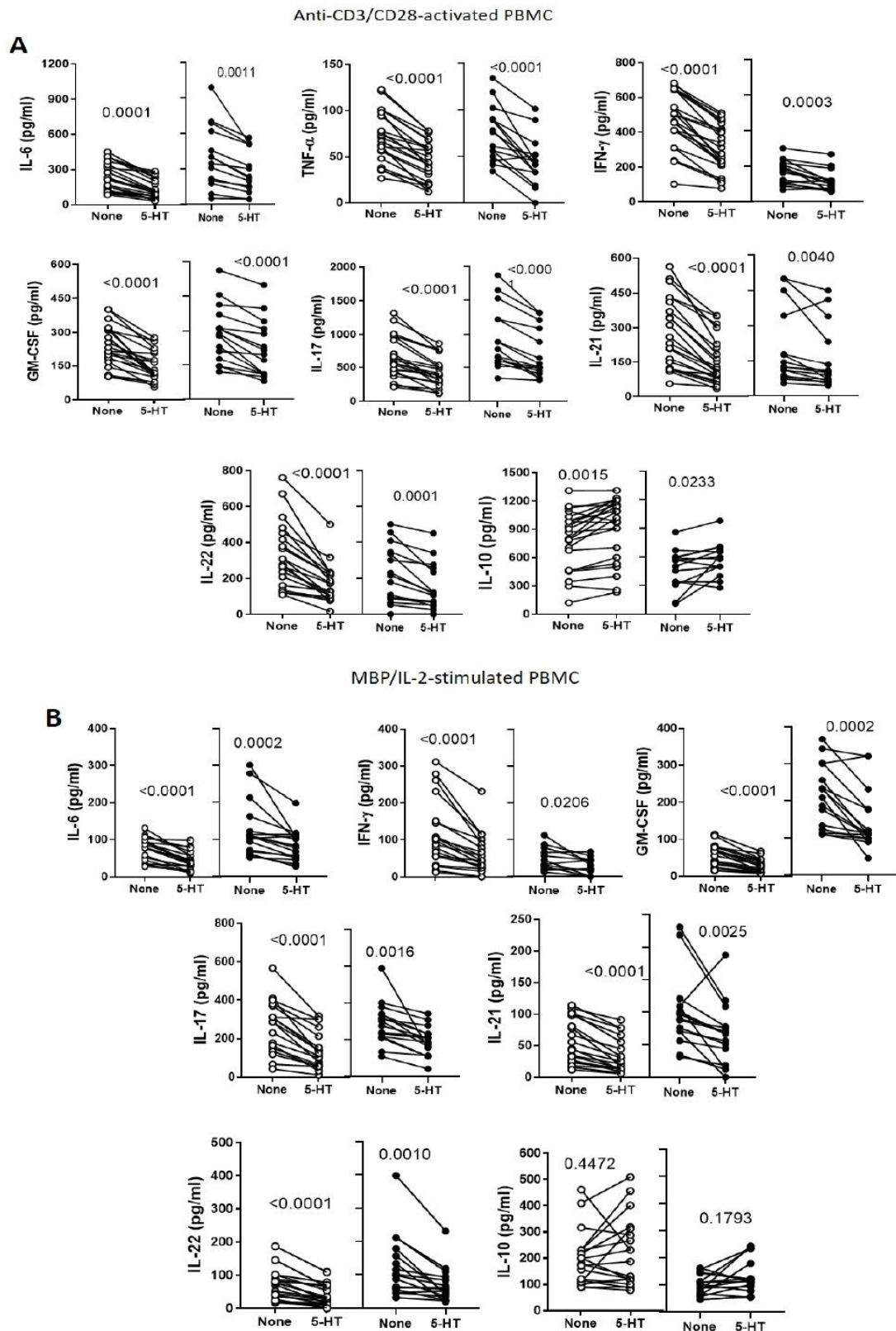


Figure 9. The modulatory effects of serotonin (5-HT) on cytokine production by PBMC of MS patients with or without MDD. The PBMC cultures ($1 \times 10^6/\text{mL}$) from MS patients with

(MS/MDD) or without (MS) MDD were activated for 3 days with anti-CD3/anti-CD28 beads (A) or for 5 days with PBM/IL-2 (B). The effect of serotonin on cytokine production was determined after addition of 200 ng/mL of 5-HT. The different cytokine levels were assayed by Luminex. Data are shown as mean $\pm$ SD and significance was calculated by comparing MS and MS/MDD (*p* values indicated in the figures).

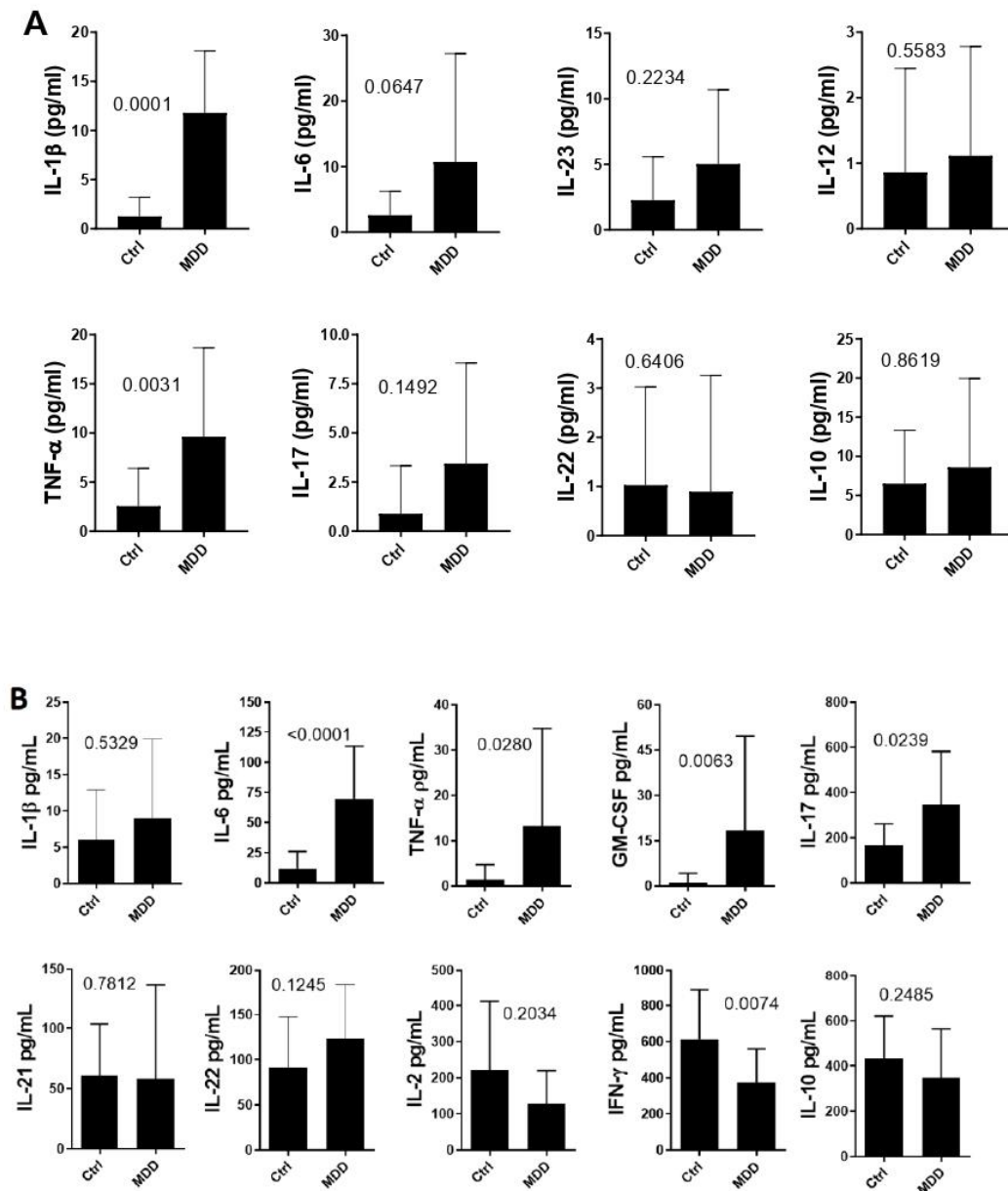


Figure S1. The impact of major depression on the levels of cytokines in non-MS. The levels of different cytokines in the (A) plasma and (B) PBMC cultures ($1 \times 10^6/\text{mL}$) activated for 3d with anti-CD3/anti-CD38 beads were assayed from non-MS subjects without (Ctrl) or with major depressive disorder (MDD) by using Luminex. Significance was calculated by comparing Ctrl versus MDD and the p values indicated in the figure.

3. DISCUSSÃO

A Esclerose Múltipla remitente-recorrente (EM-RR) é uma doença autoimune desmielinizante do SNC, mediada por células T dirigidas contra a bainha de mielina (Reich *et al*, 2018; Thompson *et al*, 2018). Assim como em outras doenças autoimunes, a frequência e a gravidade das recaídas clínicas podem ser influenciadas por diferentes fatores ambientais, como o transtorno depressivo maior (TDM) (Mohr *et al*, 2004). A depressão é a desordem psiquiátrica mais diagnosticada em pacientes com EM, com uma prevalência estimada de 15 a 25% nos adultos jovens (Murphy *et al*, 2017). Vários estudos mostraram que esse transtorno acomete mais pacientes com EM que indivíduos saudáveis (Solaro *et al*, 2018; Palé *et al*, 2017; Patten *et al*, 2003) e tem sido associado à atividade da doença (Mohr *et al*, 2004).

Na etiologia da TDM, uma das hipóteses mais bem aceitas envolve uma redução da biodisponibilidade da serotonina (5-HT) (Cowen & Browning, 2015), um neurotransmissor com diferentes funções imunológicas (Herr *et al*, 2017). Diante do exposto, com o objetivo de estudar os mecanismos de ação desse neurotransmissor sobre o status funcional das células T de pacientes com EM-RR, o primeiro artigo, publicado na *European Journal of Immunology*, centralizou o estudo desses mecanismos nas células de pacientes saudáveis e com EM. Adicionalmente, no segundo artigo, submetido à *Brain, Behavior and Immunity*, foi investigado fenômenos semelhantes, porém, avaliando o impacto da depressão na resposta imunológica das células T desses pacientes, estimuladas com mitógeno e com a proteína básica da mielina (PBM). A PBM é um autoantígeno, que está presente na bainha de mielina e nos oligodendrócitos, e está intimamente relacionado ao processo etiológico da EM (Katsara & Apostolopoulos, 2018; Harp *et al*, 2010).

Um dos eventos clássicos da resposta imune é a proliferação, induzida pela secreção da IL-2 pelos linfócitos TCD4⁺ antígenos-específicos (Dustin *et al*, 2006; Henrickson & Von Adrian, 2007). No presente estudo, foi demonstrado que as células dos pacientes com EM proliferaram menos em resposta ao mitógeno, quando comparado a indivíduos saudáveis, e que a ocorrência de depressão nos pacientes induziu uma menor proliferação das células T, em resposta ao mitógeno e à PBM. Essa menor proliferação pode ser em decorrência de uma menor produção de IL-2 (Bachmann & Oxenius, 2007). Além da proliferação, a produção de citocinas por diferentes fenótipos de células T é extremamente importante para que as respostas imunes sejam executadas.

Dos diferentes fenótipos envolvidos na patogênese da EM e seu modelo animal – a Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE), um dos principais é o Th17 mielina-específica. Através da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-17, IFN- γ e IL-22, as células Th17 patogênicas têm um papel crucial para a formação das lesões no SNC, uma vez que favorecem a quebra da barreira hematoencefálica (BHE) (Kebir *et al*, 2007), ao alterarem a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais (Setiadi *et al*, 2019; Wanke *et al*, 2018), induzem a ativação da micróglia e levam ao recrutamento de outras células do Sistema Imune (Pelletier *et al*, 2010; Korn *et al*, 2009), produtoras de radicais livres e metaloproteinase 9. Além de inibirem a maturação e a sobrevivência dos oligodendrócitos (Kang *et al*, 2013), células responsáveis pela produção da mielina, bem como induzirem sua apoptose (Paintlia *et al*, 2011). Tudo isso corrobora com o processo de desmielinização neuronal (Lovett-Racke *et al*, 2011), que leva à manifestação de sinais e sintomas.

No primeiro artigo, foi observado que as células T de pacientes com EM produziram mais IL-6, IL-17 e IL-22, e apresentaram uma maior proporção de células Th17, o que foi demonstrado também em outros estudos (Wing *et al*, 2015; Lovett-Racke *et al*, 2011; Brucklacher-Waldert *et al*, 2009; Lock *et al*, 2002; Matusevicius *et al*, 1999). Quando esses parâmetros imunes foram correlacionados com a incapacidade dos pacientes, não foi observada diferença significativa, o que pode ser justificado pelo baixo score do EDSS, significando pouca ou nenhuma incapacidade neurológica, na coorte de pacientes.

No segundo artigo, a depressão mostrou favorecer maiores níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6 e IL-17 nos pacientes com EM. Além disso, os níveis plasmáticos de IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23 foram correlacionados positivamente com a incapacidade neurológica, determinada pelo EDSS. Com relação à gravidade da depressão, avaliada pelo somatório do questionário de depressão, quanto mais grave a depressão, maiores os níveis circulantes de IL-1 β , TNF- α e IL-17. Estudo recente por Sales e colaboradores (2021) mostrou que pacientes com EM e depressão apresentaram níveis séricos de IL-1 β e IL-6 aumentados, o que estava diretamente correlacionado com a incapacidade neurológica dos pacientes. Li e colaboradores (2019) mostraram que pacientes com artrite reumatoide apresentaram níveis séricos aumentados de IL-17 e IL-6, o que foi correlacionado com distúrbios no humor desses pacientes, principalmente os sintomas depressivos.

Além disso, esse transtorno de humor elevou os níveis de citocinas associadas às células Th17, como IL-6 e IL-17, em resposta ao mitógeno. Por outro lado, essas células produziram menores níveis de INF- γ e IL-10. De fato, a estimulação policlonal em pacientes com depressão favoreceu uma expressão maior de células T IL-17⁺, em ambos os

compartimentos CD4⁺ e CD8⁺. Com a estimulação específica, foram observados maiores níveis de IL-6, GM-CSF, IL-21 e IL-22 pelas células T mielina-específicas desses pacientes. A presença do TDM elevou a proporção de células TCD4⁺IL-22⁺ e células TCD8⁺GM-CSF⁺ nessas culturas. Vários estudos identificaram altos níveis de citocinas pro-inflamatórias, em especial as da tríade inflamatória, em pacientes com estresse psicológico e depressão maior (Goldsmith *et al*, 2016; Udina *et al*, 2012; Dowlati *et al*, 2010). Esse aumento na produção de citocinas pelas células de pacientes com TDM pode, em parte, explicar a correlação com a EM, uma vez que essas citocinas induzem a neurotoxicidade (Kim & Won, 2017). Os fenômenos observados nesse estudo sugerem que a TDM pode contribuir com a gravidade da EM, ao favorecer a expansão de fenótipos de células T encefalitogênicos.

Ademais, quanto maior a incapacidade neurológica do paciente, maior foi a produção de IL-17 e GM-CSF, e quanto maior a gravidade da depressão, maiores os níveis de IL-17 e IL-6 estavam presentes no sobrenadante das culturas das células T em resposta ao mitógeno. Finalmente, com a estimulação específica, observou-se que quanto maior a incapacidade, maior a produção de IL-6 e a porcentagem de células TCD8⁺IL-17⁺. A gravidade da depressão nesse sistema foi correlacionada positivamente com a produção de IL-6, IL-17, IL-21, IL-22 e GM-CSF. Essas correlações positivas entre citocinas relacionadas ao fenótipo Th17 e o EDSS e o BDI reforçam o papel dessas citocinas no dano dirigido contra a bainha de mielina e na gravidade da depressão, e ajudam na compreensão dos mecanismos envolvidos na susceptibilidade de recaídas clínicas graves nos pacientes com EM.

Elevados níveis de citocinas, como IL-6 e IL-21, podem comprometer a função das células T reguladoras dos pacientes com EM (Astier *et al*, 2006; Haas *et al*, 2014; Viglietta *et al*, 2004). De fato, muitas doenças autoimunes têm seu desenvolvimento atrelado a disfunções no compartimento regulador, como deficiências numéricas e funcionais de células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ e células Tr1 (FoxP3⁺IL-10⁺). Durante as recaídas clínicas, vários estudos observaram deficiências nessas células nos pacientes com EM (Carbone *et al*, 2014; Haas *et al*, 2014; Kouchaki *et al*, 2014; Venken *et al*, 2008; Astier *et al*, 2006; Viglietta *et al*, 2004).

Com relação ao compartimento de células T reguladoras, além da produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, algumas moléculas são extremamente importantes no processo de inibição da resposta inflamatória. A molécula CD25 na superfície das células Tregs, através do consumo de IL-2 exógeno, pode diminuir as funções efectoras das células T (Chen *et al*, 2016). A molécula CTLA-4 (do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4*) – o CD152 – controla a resposta inflamatória ao se ligar às moléculas da família B7

nas células apresentadoras de antígenos, porém de maneira inibitória, limitando a secreção de IL-2, o que impacta diretamente com a proliferação dos linfócitos T (Afshar *et al*, 2019; Carreno *et al*, 2000). As células Tregs clássicas apresentam o FoxP3, um fator de transcrição no citosol, que regula uma via de sinalização envolvida na supressão do processo inflamatório (Shevach *et al*, 2006; Liu *et al*, 2006). Outra molécula importante, que tem sido associada com a funcionalidade das células Tregs, é a CD39, uma vez que degrada a adenosina trifosfato em adenosina monofosfato, assim reduzindo a inflamação (Nagate *et al*, 2021; Ochoa-Repáraz *et al*, 2017).

O primeiro artigo mostrou que os pacientes com EM possuem uma menor proporção de células TCD4⁺ FoxP3⁺IL-10⁺CD39⁺ quando comparado ao grupo controle, o que foi mais evidente nos pacientes com maior número de lesões ativas cerebrais. Corroborando com esses achados, estudo conduzido por Borsellino e colaboradores (2007) observou que pacientes com EM possuem menor frequência de células Tregs CD39⁺ circulantes que os indivíduos saudáveis. No segundo artigo, foi possível explorar essas células no contexto da depressão nos pacientes com EM e foi visto que a ocorrência da depressão diminuiu os níveis de IL-10 quantificados no plasma e no sobrenadante de culturas de células T mielina-específicas. Os níveis dessa citocina anti-inflamatória foram correlacionados negativamente com a gravidade da depressão. Além disso, foi observado que pacientes com depressão apresentaram níveis menores dos marcadores CTLA-4, IL-10 e FoxP3 nas células TCD4⁺ CD39⁺ e CD25⁺CD39⁺ em resposta ao mitógeno. Ademais, uma baixa proporção destas células, em resposta à PBM, expressando o CTLA-4, foi observada em pacientes com TDM. Adicionalmente, quanto maior a incapacidade neurológica do paciente, menor foi a proporção de células TCD4⁺CD25⁺CD39⁺ mielina-específicas e, de forma interessante, a gravidade da depressão foi correlacionada negativamente com a proporção das células TCD4⁺CD39⁺ e TCD4⁺CD25⁺CD39⁺, que expressavam o CTLA-4, porém não produziam IL-10. Esses achados demonstram que, além da exacerbação na produção de citocinas relacionadas à patogênese da EM, há um impacto negativo da depressão no compartimento de células T reguladoras dos pacientes, o que pode comprometer o curso clínico da doença pelo prejuízo na função das células Treg.

A excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias associada a um defeito funcional no compartimento regulador pode contribuir com a patogênese da EM, além de promover a depleção de triptofano, um aminoácido essencial para a síntese de serotonina, em favorecimento do aumento dos metabólitos da quinurenina (Badawy, 2013), auxiliando no processo neurotóxico. Sabe-se que a etiologia da TDM está associada com a redução da

produção de monoaminas, especialmente 5-HT (Cowen & Browning, 2015), e que a neurotransmissão serotoninérgica encontra-se alterada no cérebro de pacientes com EM (Hesse *et al*, 2014). Além de ser um neurotransmissor conhecido do SNC, a 5-HT possui diversas funções periféricas, como nas células do sistema imune, de forma dose-dependente e através da interação com seus diversos receptores (5-HT₁₋₇) (Herr *et al*, 2017; Shajib & Khan, 2014).

A serotonina, no primeiro artigo, mostrou ser capaz de diminuir a proliferação das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias relacionadas aos perfis de células Th1 e Th17 tanto dos pacientes como de indivíduos saudáveis. Esse efeito foi observado tanto no compartimento de células TCD4⁺ quanto no TCD8⁺. Ademais, a 5-HT diminuiu a frequência das células Th1 e Th17 clássicas. De forma interessante, esse neurotransmissor aumentou a frequência de células Th17.reg, um novo subtipo capaz de produzir a IL-10 e controlar o processo inflamatório (Lee *et al*, 2015; Peters *et al*, 2011; Shi *et al*, 2010), e a frequência das células Tregs (FoxP3⁺IL-10⁺) funcionais – CD39⁺, o que foi correlacionado negativamente com a incapacidade neurológica dos pacientes. Além disso, observou-se um aumento na produção de IL-10 nas culturas e na função supressora das células Treg, observada no sistema de co-cultura entre células TCD4 efetoras (CD25⁺CD127⁺) e reguladoras (CD25⁺CD127^{neg/low}).

A ocorrência da depressão, demonstrado no segundo artigo, não limitou que esse neurotransmissor diminuísse a produção de citocinas altamente encefalitogênicas nas culturas de células T em resposta ao mitógeno e à PBM. Porém, a serotonina só foi capaz de aumentar a produção de IL-10 em resposta ao mitógeno. No geral, a produção dessa citocina anti-inflamatória pelas células T mielina-específicas foi menor e um pouco variada entre os pacientes, possivelmente em decorrência da menor capacidade dessas células em produzirem a IL-10. De forma interessante, o presente estudo sugere um efeito benéfico da serotonina, pois diminuiu a produção das principais citocinas envolvidas na neuroinflamação na EM, e que o tratamento da depressão com SSRI pode ser um tratamento adjuvante na EM.

A neurotransmissão serotoninérgica é dependente da interação da serotonina com seus receptores presentes nas membranas das células e, como existem 7 tipos de receptores e diversas subclasses, seus efeitos podem variar. Herr e colaboradores (2017) mostraram que diversas células do sistema imune possuem diferentes receptores, além de toda a maquinaria necessária para a síntese, recaptação e degradação da 5-HT (Tabela 1), e podem sofrer diferentes imunomodulações.

Dessa forma, esse neurotransmissor ao interagir com os receptores 5-HT₄ e 5-HT₇ nas células mononucleares de indivíduos saudáveis induziu o aumento da produção de IL-6 e IL-

10; nesse sistema, os agonistas do receptor 5-HT₄ reduziram a produção de IFN- γ (Müller *et al*, 2009). Estudo por Tsuchida e colaboradores (2011) mostrou que os receptores 5-HT₄ induzem uma via de sinalização que aumenta o lançamento de acetilcolina dos neurônios colinérgicos mioentéricos, o que diminui significativamente a produção da tríade inflamatória – IL-6, IL-1 β e TNF- α – pelos monócitos ativados com lipopolissacarídeo (LPS). Adicionalmente, a produção de TNF- α pelas células mononucleares estimuladas com o LPS foi inibida pela utilização de um agonista do receptor 5-HT_{2A} (Snir *et al*, 2013). Num modelo de artrite reumatoide experimental, induzida por colágeno, Chabbi-Achengli e colaboradores (2016) mostraram que a serotonina ao interagir com o receptor 5-HT_{2A}, reduziu a gravidade da doença nos camundongos. Nesses animais, tanto a serotonina como os agonistas do receptor 5-HT_{2A} reduziram a porcentagem de células Th17 colágeno-específicas.

Por outro lado, o uso de agonistas do receptor 5-HT₃ induziu a ativação das células T (la Vega *et al*, 2005). Ainda com relação a esse receptor, o 5-HT₃, na EAE, estudo com seus antagonistas mostrou atenuar a doença, provavelmente por diminuir a produção de IL-17 e IL-6 pelas células TCD4⁺ específicas para a glicoproteína da mielina do oligodendrócitos [MOG (do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*)] e pela baixa desmielinização da medula espinhal (Aminiam *et al*, 2013). Assim, pode-se observar que os diferentes efeitos imunomoduladores estão atrelados à expressão diferenciada dos subtipos de receptores nas células imunes. Ademais, a capacidade da serotonina em elevar a frequência de diferentes subtipos de células T reguladoras e diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias pode explicar em parte o motivo pelo qual Foley e colaboradores (2014), ao administrarem fluoxetina, um antidepressivo da classe dos Inibidores Seletivos da Recaptação de Serotonina (SSRI), que aumenta a concentração de serotonina extracelular, para pacientes com EM, observaram uma melhora clínica.

No modelo de EAE, o uso de SSRI foi capaz de diminuir a proliferação das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando, assim, a gravidade da doença (Scott *et al*, 1983). Estudo por Sales e colaboradores (2021) mostrou que o tratamento de pacientes com os SSRI foi capaz de reduzir, *in vitro*, a frequência e a responsividade de células Th17 aos ligantes dos receptores do tipo *Toll* (TLR)-2 e TLR4. Pacientes tratados com antidepressivos apresentaram menores níveis de citocinas pro-inflamatórias. Gobin e colaboradores (2013) mostraram que o tratamento com fluoxetina teve um efeito inibitório, *in vitro*, na proliferação de células T de indivíduos saudáveis em resposta ao mitógeno. Um dos mecanismos pelos quais os SSRIs reduzem a proliferação pode envolver a modulação negativa da expressão de moléculas coestimulatórias. De maneira dose-dependente, alguns

estudos têm mostrado que os SSRI atenuam a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos monócitos e pelas células T (Kubera *et al*, 2001; 2012; Xia *et al*, 1996). Adicionalmente, a produção de TNF- α e óxido nítrico foi diminuída pela micróglia quando ativada com LPS e tratada com SSRI (Tynan *et al*, 2012).

De forma interessante, os achados neste estudo sugerem que a serotonina possui efeitos neuroprotetores, ao diminuir a produção de citocinas encefalitogênicas e ao aumentar a funcionalidade das células Tregs, e que uma diminuição da sua biodisponibilidade, levando ao desenvolvimento do TDM, pode acarretar numa exacerbação do status inflamatório das células T de pacientes com EM. Esses achados podem corroborar para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem tratar os pacientes com EM e depressão com os SSRI, e melhorar tanto a qualidade de vida desses pacientes como o seu curso clínico, retardando ou inibindo a progressão da doença.

CONCLUSÃO

Os resultados mostram que a depressão deve impactar no curso clínico da Esclerose Múltipla (EM), ao favorecer o desequilíbrio na produção de citocinas pelas células T implicadas na patogênese da doença, com a expansão de subtipos de células Th1, Th17 e Th22, além da redução da frequência de células T reguladoras CD39⁺, especialmente as que expressam o CTLA-4. Além disso, foi evidenciada a habilidade da serotonina em atenuar a produção das citocinas encefalitogênicas e em aumentar a produção de IL-10, assim como a frequência de células Tregs funcionais, sugerindo um efeito neuroprotetor desse neurotransmissor no contexto da doença. Logo, uma menor disponibilidade desse neurotransmissor em pacientes com TDM pode corroborar com a gravidade da EM, assim sendo o tratamento desse transtorno de humor extremamente importante, para ajudar no prognóstico do paciente.

Pelo fato de a EM ser uma doença inflamatória crônica, com graves danos neuronais, causados por células altamente encefalitogênicas, e a depressão favorecer esses tipos celulares, o que é correlacionado com a sua gravidade, é extremamente importante o diagnóstico da depressão de forma precoce nesses pacientes e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas multiprofissionais, que corroborem com o aumento da serotonina, como, por exemplo, a administração de SSRI, visto que a serotonina mostrou ter efeitos imunorreguladores. Mais estudos que avaliem o impacto do tratamento com esses SSRI são necessários para consolidar os achados nesse estudo.

REFERÊNCIAS

- Adams, R.D., Victor, M., (1989). Multiple sclerosis and allied demyelinating diseases. *Principles of Neurology*, 4:755-774.
- Afshar, B., Khalifehzadeh-Esfahani, Z., Seyfizadeh, N., Danbarán, G.R., et al., (2019). The role of immune regulatory molecules in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 337:577061.
- Aharoni, R., (2014). Immunomodulation neuroprotection and remyelination - the fundamental therapeutic effects of glatiramer acetate: a critical review. *J Autoimmun.*, 54:81-92.
- Almolda, B., Costa, M., Montoya, M., Gonzalez, B., Castellano, B., (2011). Increase in Th17 and T-reg lymphocytes and decrease of IL22 correlate with the recovery phase of acute EAE in rat. *PLoS ONE*, 6, e27473.
- Alves-Leon, S.V., Malfetano, F.R., Pimentel, M.L., Estrada, C.L., Pereira, V.C., et al., (2008). Multiple sclerosis outcome and morbi-mortality of a Brazilian cohort of patients. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 66:671-677.
- Aminian, A., Noorbakhsh, F., Ghazi-Khansari, M., Kafami, L., Javadi, S., et al., (2013). Trolox diminishes demyelination and disease severity in an animal model of multiple sclerosis. *Neuroscience*, 248:299-306.
- Anderson, G., Rodriguez, M., (2015). Multiple sclerosis: The role of melatonin and N-acetylserotonin. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*; 4:112-123.
- Arneth, B.M., (2019). Impact of B cells to the pathophysiology of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, 16:128.
- Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., Hafler, D.A., (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.*, 116:3252–3257.
- Axtell, R.C., Raman, C., Steinman, L., (2013). Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.*, 44(2):114-20.
- Azizi, G., Simhag, A., El Roubi, N.M.M., Mirshafiey, A., (2015). Th22 Cells Contribution in Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* Jun;14(3):246-54.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., et al., (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med*; 192(3):393–404.
- Bachmann, M.F., Oxenius, A., (2007). Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.*, 8(12):1142-1148.

- Badawy, A.A., (2013). Tryptophan: the key to boosting brain serotonin synthesis in depressive illness. *J. Psychopharmacol.* 27(10):878-93.
- Barnett, M.H., Prineas, J.W., (2004). Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology*; 55(4):458–68.
- Basdeo, S.A., Cluxton, D., Sulaimani, J., Moran, B., et al., (2017). ExTh17 (Nonclassical Th1) cells are functionally distinct from classical Th1 and Th17 cells and are not constrained by regulatory T cells. *J Immunol.*; 198:2249–59.
- Becher, B.; Durell, B.G.; Noelle, R.J., (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.*, 110:493–97.
- Beck, A.T., Steer, R.A., (1993). Manual for the Beck Depression Inventory. San Antonio, TX: *Psychological Corporation*; 1993.
- Beck, A.T., Steer, R.A., Brown, G.K., (1996). Manual for Beck Depression Inventory II (BDI-II). San Antonio, TX: *Psychology Corporation*.
- Beiske, A.G., Svensson, E., Sandanger, I., Czujko, B., et al., (2008). Depression and anxiety amongst multiple sclerosis patients. *Eur. J. Neurol.*, 15(3):239–245.
- Belmaker, R.H., Agam, G., (2008). Major depression disorder. *N Engl J Med*; 358:55-68.
- Benton, T., Lynch, K., Dubé, B., Gettes, D.R., Tustin, N.B., et al., (2010). Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Suppression of HIV Infectivity and Replication. *Psychosom Med.*, 72(9): 925-932.
- Berger, M., Gray, J.A., Roth, B.L., (2009). The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med*, 60:355–66.
- Bjartmar, C., Wujek, J.R., Trapp, B.D., (2003). Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J. Neurol. Sci.*, 206:165–171.
- Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., et al., (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4):1225–1232.
- Bowen, J.D., (2019). Highly Aggressive Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis and other CNS Inflammatory Diseases*, 25(3):689-714.
- Brambilla, R., (2019). The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.*, 137(5):757-783.
- Branco-De-Almeida, L.S., Kajiya, M., Cardoso, C.R., Silva, M.J.B., Ohta, K., et al., (2011). Selective serotonin reuptake inhibitors attenuate the antigen presentation from dendritic cells to effector T lymphocytes. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 62(3): 283–294.

- Brenhouse, H.C.; Schwarz, J.M., (2016). Immunoadolescence: Neuroimmune development and adolescent behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 70, 288–299.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuerner, K., Kolster, M., Wolthausen, J., Tolosa, E., (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain*, 132(12):3329-41.
- Canto, E., Oksenberg, J.R., (2018). Multiple sclerosis genetics. *Multiple Sclerosis J.*, 24, 75–79.
- Capone, A., Bianco, M., Ruocco, G., De Bardi, M., Battistini, L., et al., (2019). Distinct expression of inflammatory features in T helper 17 cells from multiple sclerosis patients. *Cells*, 8 (6): 533.
- Carbone, F., De Rosa, V., Carrieri, P.B., Montella, S., Bruzzese, D et al., (2014). Regulatory T cell proliferative potential is impaired in human autoimmune disease. *Nat. Med.*, 20(1):69–74.
- Carreno, B.M., Bennett, F., Chau, T.A., Ling, V., Luxenberg, D. et al., (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J Immunol.*, 165(3):1352-6.
- Chabbi-Achengli, Y., Coman, T., Collet, C., Callebert, J., Corcelli, M., et al., (2016). Serotonin is involved in autoimmune arthritis through Th17 immunity and bone resorption. *Am J Pathol.*, 186(4):927-37.
- Chaves, M.L.F., Finkelsztejn, A., Stefani, M.A., (2008). Rotinas em Neurologia e Neurocirurgia. Porto Alegre. *Artmed*, 2008. Capítulo “Escalas em Neurologia”.
- Chen, X., Du, Y., Lin, X., Qian, Y., Zhou, T., Huang, Z., (2016). CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in tumor immunity. *Int Immunopharmacol.*, 34:244-9.
- Choi, M.J., Lee, H.J., Lee, H.J., Ham, B.J., Cha, J. H., et al., (2004). Association between major depressive disorder and the -1438A/G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene. *Neuropsychobiology*, 49(1), 38–41.
- Choi, W., Kim, J., Kang, H., Kim, H.K., Kang, H., Lee, J et al., (2021). Interaction effect of serum serotonin level and age on the 12-week pharmacotherapeutic response in patients with depressive disorders. *Sci Rep.*, 11:24226.
- Chu, C.Q., Wittmer, S., Dalton, D.K., (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 192: 123–128.
- Chun, J., Hartung, H.P., (2010). Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol.*, [S.l.], 33(2): 91-101.

- Cocco, E., Murgia, F., Loreface, L., Barberini, L., et al., (2016). ¹H-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation.*; 3:e185.
- Codarri, L., Györfeszi, G., Tosevski, V., Hesske, L., Fontana, A., et al., (2011). ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*; 12(6):560–567.
- Cores, E.V., Vanotti, S., Burin, D.I., Politis, D.G., Villa, A., (2014). Factors associated to the work situation of patients with multiple sclerosis. *Rev Neurol.*, 16;58(4): 175-83.
- Cowen, P.J., Browning, M., (2015). What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry*, 14:158–160.
- Cross, A.H., Stark, J.L., Lauber, J., Ramsbottom, M.J., Lyons, J.A., (2006). Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 180:63–70.
- Cubala, W.J., Landowski, J., Dziadziuszko, M., Chrzanowska, A., Wielgomas, B., (2016). Magnesium, C-reactive protein, and cortisol in drug-naïve patients with short illness-duration, first episode major depressive disorder: Possible immunomodulatory role for magnesium. *Magnes. Res.*, 29:169–174.
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., et al., (2017). Multiple sclerosis: immunopathology and treatment update. *Brain Sci.* 7(7):78.
- Dáz, C., Zarco, L.A., Rivera, D.M., (2019). Highly active multiple sclerosis: An update. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 215–224.
- de Miranda, A.S., Zhang, C.J., Katsumoto, A., Teixeira, A.L., (2017). Hippocampal adult neurogenesis: Does the immune system matter? *J. Neurol. Sci.*; 372,:482–495.
- Deck, N., Lee, W., Berneman, Z.N., Cools, N., (2013). Neuroendocrine Immunoregulation in Multiple Sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology*, 1-23.
- Dhaeze, T., Peelen, E., Hombrouck, A., Peeters, L., Van Wijmeersch, B., et al., (2015). Circulating follicular regulatory T cells are defective in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 195:832–840.
- do Prado, C.H., Narahari, T., Holland, F.H., Lee, H.N., Murthy, S.K., Brenhouse, H.C., (2016). Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress. *Dev. Psychobiol.*, 58:482–491.
- Dorszewska, J., Prendecki, M., Oczkowska, A., Rozycka, A., Lianeri, M., Kozubski, W., (2013). Polymorphism of the COMT, MAO, DAT, NET and 5-HTT genes, and biogenic amines in Parkinson's disease. *Current Genomics.*; 14:518-533.
- Dowlati, Y., Herrmann, N., Swardfager, W., et al., (2010). A meta-analysis of cytokines in major depression. *Biol Psychiatry.*, 67(5):446-457.

- Duerschmied, D., Canault, M., Lievens, D., Brill, A., Cifuni, S.M., et al., (2009). Serotonin stimulates platelet receptor shedding by tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17). *J Thromb Haemost*, 7:1163–71.
- Dunn, E.C., Brown, R.C., Dai, Y., Rosand, J., Nugent, N.R., et al., (2015). Genetic determinants of depression: Recent findings and future directions. *Harvard Review of Psychiatry*, 23(1):1–18.
- Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Peguillet, I., Premel, et al., (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161^{hi} IL-17-secreting T cells. *Blood*, 117:1250–1259.
- Dustin, M.L.; Tseng, S.Y.; Varma, R.; Campi, G., (2006). T-cell-dendritic cell immunological synapses. *Cur Opin Immunol.*, 18: 512-16.
- Dutta, R., Trapp, B.D., (2011). Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis. *Prog. Neurobiol.*, 93(1):1–12.
- Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A.M., Dewachter, L., Fadel, E., et al., (2006). Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*, 113:1857–64.
- El-Salhy, M., Gundersen, D., Hatlebakk, J.G., Hausken, T., (2012). High densities of serotonin and peptide YY cells in the colon of patients with lymphocytic colitis. *World J Gastroenterol*, 18(42):6070-6075.
- Evrensel, A., Ceylan, M.E., (2015). The gut-brain axis: the missing link in depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci*, 13:239-244.
- Falcon, S., (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.*, 9:407;
- Faraj, B.A., Olkowski, Z.L., Jackson, R.T., (1994). Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes. *Int J Immunopharmacol*, 16:561–7.
- Farber, R.S.; Sand, I.K., (2015). Optimizing the initial choice and timing of therapy in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.*, 8(5):212-232;
- Fassas, A., Mancardi, G.L., (2008). Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: is it worthwhile? *Autoimmunity*, 41(8): 601–10;
- Ferber, I.A., Brock, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., et al., (1996). Mice with a disrupted IFN- γ gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*, 156:5–7;
- Filippi, M., Rocca, M.A., Ciccarelli, O., et al., (2016). MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet neurology.*, 15(3):292-303.
- Finocchiaro, L.M., Arzt, E.S., Fernández-Castelo, S., Criscuolo, M., Finkielman, S., Nahmod, V.E., (1988). Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells:

stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway. *J Interferon Res*, 8:705–16.

Fletcher, J.M., Lonergan, R., Costelloe, L., et al., (2009). CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol*, 183(11):7602–10.

Foley, P., Lawler, A., Chandran, S., Mead, G., (2014). Potential disease-modifying effects of selective serotonin reuptake inhibitors in multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(6):709–710.

Frisullo, G., Nociti V, Lorio R, Patanella A K, Caggiula M et al., (2009). Regulatory T cells fail to suppress CD4⁺T- bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients. *Immunology* 127, 418–428.

Fung, T.C., Olson, C.A., Hsiao, E.Y., (2017). Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. *Nat. Neurosci.*, 20(2):145–155.

Gerhard, D.M., Wohleb, E.S., Duman, R.S., (2016). Emerging treatment mechanisms for depression: focus on glutamate and synaptic plasticity. *Drug Discov Today*, 21(3):454–464.

Gershon, M.D., Tack, J., (2007). The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, 132(1):397–414.

Gharagozloo, M., Gris, K.V., Mahvelati, T., Amrani, A., Lukens, J.R., Gris, D., (2018). NLR-Dependent Regulation of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*. 8:2012.

Ghasemi, N., Razavi, S., Nikzad, E., (2017). Multiple sclerosis: pathogenesis, symptoms. Diagn. Cell-Based Therapy. *Cell J.*, 19(1):1–10.

Gobin, V., Steendam, K.V., Fevery, S., Tilleman, K., Billiau, A.D., et al., (2013). Fluoxetine Reduces Murine Graft-Versus-Host Disease by Induction of T cell Immunosuppression. *J NeuroimmunePharmacol*, 8(4):934–943;

Goldsmith, D.R., Rapaport, M.H., Miller, B.J., (2016). A meta-analysis of blood cytokine network alterations in psychiatric patients: comparisons between schizophrenia, bipolar disorder and depression. *Molecular Psychiatry*, 21:1696–1709.

Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsche, B., Falk, C.S., et al., (2005). Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*, 35(11):3343–3352.

Haas, J., Schwarz, A., Korporal-Kunke, M., Jarius, S., Wiendl, H., et al., (2014). Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, 21(12):1521–32.

Hamel, E., (2007). Serotonin and migraine: Biology and clinical implications. *Cephalalgia*, 27(11):1293–1300.

Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., et al., (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4⁺ T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *European journal of immunology*, 40(10):2942-56.

Hauser, S.L., Cree, B.A.C., (2020). Treatment of Multiple Sclerosis: A Review, *The American Journal of Medicine*, 133(12):1380-1390.

Hayden, M.J., Brown, W.A., Brennan, L., O'Brien, P.E., (2012). Validity of the Beck Depression Inventory as a screening tool for a clinical mood disorder in bariatric surgery candidates. *Obesity Surgery*, 22(11):1666–1675.

Henrickson, S.E.; Von Adrian, U.H., (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. *Cur OpinImmunol.*, 19: 249-58.

Herr, N., Bode, C., Duerschmied, D., (2017). The Effects of Serotonin in Immune Cells. *Front. Cardiovasc. Med.*, 4.

Hesse, S., Moeller, F., Petroff, D., Lobsien, D., Luthardt, J., et al., (2014). Altered serotonin transporter availability in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 41(5):27-35.

Hodes, G.E., Menard, C., Russo, S.J., (2016). Integrating interleukin-6 into depression diagnosis and treatment. *Neurobiol. Stress*, 4:15–22.

Hung, Y.Y., Kang, H.Y., Huang, K.W., Huang, T.L., (2014). Association between toll-like receptors expression and major depressive disorder. *Psychiatry Res.*, 220(1-2):283–286.

Huwiler, A., Zangemeister-Wittke, U., (2018). The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: recent findings and new perspectives. *Pharmacol Ther.*, 185:34-49.

Irwin, M.R., Miller, A.H., (2007). Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun*, 21(4):374-83.

Iwanowski, P., Losy, J., (2015). Immunological differences between classical phenotypes of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.*, 349(1-2):10–14.

Jackson, J.C., Walker, R.F., Brooks, W.H., Roszman, T.L., (1988). Specific uptake of serotonin by murine macrophages. *Life Sci*, 42(17):1641–50.

Jelcic, I., Al Nimer, F., Wang, J., et al., (2018). Memory B cells activate brain-homing, autoreactive CD4⁺ T cells in multiple sclerosis. *Cell*, 175(1):85–100.

Jersild, C., Svejgaard, A., Fog, T., (1972). HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet*, 1(7762):1240–1241.

Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.Á., et al. (1998). Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate

and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 50(3):701-708.

Jokubaitis, V.G., Spelman, T., Kalincik, T., et al., (2016). Predictors of long-term disability accrual in relapse-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol*, 80(1):89–100.

Kang, Z., Wang, C., Zepp, J., Wu, L., Sun, K., et al., (2013). Act1 mediates IL-17-induced EAE pathogenesis selectively in NG2⁺ glial cells. *Nat. Neurosci.*, 16(10):1401–1408.

Kaskow, B.J., Baecher-Allan, C., (2018). Effector T cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 8(4):a029025.

Kato, S., (2013). Recent Advances in 5-Hydroxytryptamine (5-HT) Receptor Research: How Many Pathophysiological Roles Does 5-HT Play via Its Multiple Receptor Subtypes? *Biol. Pharm. Bull.*, 36(9): 1406–1409.

Katsara, M., Apostolopoulos, V., (2018). Editorial: Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Therapeutics. *Medicinal Chemistry*, 14(2):104-105.

Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., et al., (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 66(3):390–402.

Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., et al., (2007). Human Th17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.*, 13(10):1173–1175.

Khan, W.I. & Ghia, J.E., (2010). Gut hormones: emerging role in immune activation and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 161(1):19–27;

Kieseier, B.C., (2014). Defining a role for laquinimod in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.*, 7(4):195–205.

Kim, K., (2012). Dermatitis Focused on the Role of Serotonin. *BiomolTher.*, 20(6): 506-512.

Kim, Y.K., Won, E., (2017). The Influence of stress on neuroinflammation and alternations in brain structure and function in major depressive disorder. *Behav. Brain Res.*, 329:6–11.

Kim, Y.K., Won, E., (2017). The Influence of stress on neuroinflammation and alterations in brain structure and function in major depressive disorder. *Behav. Brain Res.*, 329:6–11.

King, I.L., Kroenke, M.A., Segal, B.M., (2010). GM-CSF-dependent, CD103⁺ dermal dendritic cells play a critical role in Th effector cell differentiation after subcutaneous immunization. *J Exp Med.*, 207(5):953–61.

Kitz, A., Singer, E., Hafler, D., (2018). Regulatory T cells: from discovery to autoimmunity. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 8(12):a029041.

- Koch, M.W., Greenfield, J., Javizian, O., Deighton, S., Wall, W., Metz, L.M., (2014). The natural history of early versus late disability accumulation in primary progressive MS. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 86(6):615-21.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., (2009). IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 27:485–517.
- Kornek, B., (2005). An update on the use of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis: appropriate patient selection and special considerations. *Patient Prefer Adherence.*, 19(9):675-84.
- Kouchaki, E., Salehi, M., Reza Sharif, M., Nikoueinejad, H., Akbari, H., (2014). Numerical status of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in multiple sclerosis, *Iran. J. Basic Med. Sci.*, 17(4):250–255.
- Kowalczyk, M., Szemraj, J., Talarowska, M., Bliźniewska, K., Maes, M., et al., (2019). An immune gate of depression – early neuroimmune development in the formation of the underlying depressive disorder. *Pharmacological Reports*, 71(6):1299-1307.
- Kubera, M., Curztek, K., Majewska-Szczepanik, M., Szczepanik, M., Marcinska, K., et al., (2012). Inhibitory effect of antidepressant drugs on contact hypersensitivity reaction. *Pharmacological Reports*, 64(3):714-722.
- Kubera, M., Lin, A.H., Kenis, G., Bosmans, E., Van Bockstaele, D., Maes, M., (2001). Antiinflammatory effects of antidepressants through suppression of the interferon- γ /interleukin-10 production ratio. *J Clin Psychopharmacol*, 21(2):199–206.
- Kurtzke, J.F., (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11):1444–1452.
- la Veja, L., Muñoz, E., Calzado, M.A., Lieb, K., Candelario-Jalil, E., et al., (2005). The 5-HT₃ receptor antagonist tropisetron inhibits T cell activation by targeting the calcineurin pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 2005 Aug 1;70(3):369-80.
- Lassmann, H., Ransohoff, R.M., (2004). The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol*, 25(3):132–137.
- Lassmann, H., (2019). Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis. *Front Immunol*. 9.
- Latimer-Cheung, A.E., Pilutti, L.A., Hicks, A.L., et al., (2013). Effects of exercise training on fitness, mobility, fatigue, and health-related quality of life among adults with multiple sclerosis: A systematic review to inform guideline development. *Arch Phys Med Rehabil.*, 94(9):1800–1828.
- Lazibat, I., Majdak, M.R., Zupanic, S., (2018). Multiple Sclerosis: New aspects of immunopathogenesis. *Acta Clin Croat*, 57(2):352-361.
- Ledford, H., (2014). Medical research: if depression were cancer. *Nature*, 515(7526):182-184.

- Lee, Y., Kuchroo, V., (2005). Defining the functional states of Th17 cells. [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, 4(F1000 Faculty Rev):132.
- Lee, Y., Awasthi, A., Yosef, N., Quintana, F.J., Xiao, S., et al., (2012). Induction and molecular signature of pathogenic Th17 cells. *Nat. Immunol.*, 13:991– 999.
- Li, N., Ghia, J., Wang, H., Mcclemens, Y., Cote, F., et al., (2011). Serotonin Activates Dendritic Cell Function in the Context of Gut Inflammation. *Am J Pathol.*, 178(2):662–671;
- Li, R., Patterson, K., Bar-Or, A., (2018). Reassessing the contributions of B cells in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.*, 19(7):696–707.
- Li, Y., Li, H., Martin, R., Mariuzza, R.A., (2000). Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in diferente registers by two HLA-DR2 proteins. *J Mol Biol.*, 304:177–88.
- Li, Y-C., Chou, Y-C., Chen, H-C., Lu, C-C., Chang, D-M., (2019). Interleukin-6 and interleukin-17 are related to depression in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.* 22(6):980-985.
- Lill, C.M., (2014). Recent advances and future challenges in the genetics of multiple sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 5(130):1-4.
- Linker, R.A., Gold, R., (2013). Dimethyl Fumarate for Treatment of Multiple Sclerosis: Mechanism of Action, Effectiveness, and Side Effects. *Curr Neurol Neurosci Rep.*, 13(11):394.
- Linker, R.A., Haghikia, A., (2016). Dimethyl fumarate in multiple sclerosis: latest developments, evidence and place in therapy. *Ther Adv Chronic Dis*, 7(4):198–207.
- Lisak, R.P., Benjamins, J.A., Nedelkoska, L., et al., (2012). Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J. Neuroimmunol.*, 246(1-2):85–95.
- Liu, W.; Putnam, A.L.; Xu-Yu, Z.; Szot, G.L.; Lee, M.R.; et al., (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 203:1701-1711.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., et al., (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.*, 8(5):500–508.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., et al., (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 8(5):500–8.
- Lovelace, M.D., Varney, B., Sundaram, G., Franco, N.F., Ng, M.L., et al., (2016). Current evidence for a role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 7:246.

Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., Racke, M.K., (2011). Th1 versus Th17: Are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*, 1812(2):246–51.

Lublin, F. D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., et al., (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3):278–286.

Lublin, F.D., Knobler, R.L., Kalman, B., Goldhaber, M., Marini, J., et al., (1993). Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity*, 16(4):267–274.

Lycke, J., (2015). Monoclonal antibody therapies for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: differentiating mechanisms and clinical outcomes. *Ther Adv Neurol Disord.*, 8(6): 274-93.

MSIF, (2020). Atlas of MS 2020: 3rd edition of the Atlas of MS. Multiple Sclerosis International Federation. Disponível em: <https://www.msif.org/>. Acessado em: março, 2021.

Ma, A., Xiong, Z., Hu, Y., Qi, S., Song, L., et al., (2009). Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. *Intern Immunopharmacol*, 9(5):599-608.

Marchetti, I., Koster, E.H., Sonuga-Barke, E.J., De Raedt, R., (2012). The default mode network and recurrent depression: a neurobiological model of cognitive risk factors. *Neuropsychol Rev.*, 22(3):229–51.

Markianos, M., Sfagos, C., (1988). Altered serotonin uptake kinetics in multiple sclerosis. *Journal of Neurology*, 235:236-237.

Marques-Deak, A., Cizza, G., Sternberg, E., (2005). Brain-immune interactions and disease susceptibility. *Mol. Psychiatry*, 10(3):239–250.

Martin, R., Sospedra, M., Rosito, M., Engelhardt, B., (2016). Current multiple sclerosis treatments have improved our understanding of MS autoimmune pathogenesis. *European journal of immunology*, 46 (9):2078–90.

Matsui M., (2008). Multiple sclerosis immunology for clinicians. *Neurol Asia*, 13:195-8.
Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Özenci, V., Fredrikson, S., Link, H., (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler J*, 5(2):101–4.

Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., et al., (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 5:101–104.

Medrado, D., Hygino, J., Ferreira, T.B., Kasahara, T.M., Barros, P. O., et al., (2016). Vitamin D modulates different IL-17-secreting T cell subsets in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 299:8–18.

Merrill, J.E., Kono, D.H., Clayton, J., Ando, D.G., Hinton, D.R., Hofman, F.M., (1992). Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental

allergic encephalomyelitis in SJL and B10.Pl mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89:574–578.

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., et al., (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL receptor α -chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest*, 118(10):3411-3419.

Miller, A.H., (2010). Depression and immunity: a role for T cells? *Brain Behav Immun.*, 24(1):1-8.

Minguetti, G., (2001). RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NA ESCLEROSE MÚLTIPLA: Análise de 270 casos. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, 59 (3A).

Mirshafiey, A., Simhag, A., El Rouby, N.M.M., Azizi, G., (2015). T-helper 22 cells as a new player in chronic inflammatory skin disorders. *Int J Dermatol.*, 54(8):880-8.

Mishra, M.K., Wee Yong, V., (2016). Myeloid cells-targets of medication in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*, 12 (9):539–551.

Mohr, D.C., Hart, S.L., Julian, L., Cox, D., Pelletier, D., (2004). Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis. *BMJ*, 328(7442):731–735.

Monaco, F., Fumero, S., Mondino, A., Mutani, R., (1979). Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 42(7):640-641.

Monson, N.L., Cravens, P.D., Frohman, E.M., Hawker, K., Racke, M.K., (2005). Effect of rituximab on the peripheral blood and cerebrospinal fluid B cells in patients with primary progressive multiple sclerosis. *Arch. Neurol.*, 62(2):258–264.

Morris, G., Berk, M., Galecki, P., Walder, K., Maes, M., (2016). The Neuro-Immune Pathophysiology of Central and Peripheral Fatigue in Systemic Immune-Inflammatory and Neuro-Immune Diseases. *Mol Neurobiol.*, 53(2):1195-219.

Mössner, R., Lesch, K.P., (1998). Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav Immun*, 12:249–71.

Mostafavi, S., Battle, A., Zhu, X., Potash, J.B., Weissman, M.M., et al., (2014). Type I interferon signaling genes in recurrent major depression: Increased expression detected by whole-blood RNA sequencing. *Mol. Psychiatry*, 19(12):1267–1274.

Müller, N., (2017). Immunological aspects of the treatment of depression and schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19(1):55-63.

Müller, T., Dürk, T., Blumenthal, B., Grimm, M., Cicko, S., et al., (2009). 5-Hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One*, 4(7):e645.

Muranski, P., Restifo, N.P., (2013). Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*, 121(13):2402–14.

Murphy, R., O'Donoghue, S., Counihan, T., et al., (2017). Neuropsychiatric syndromes of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88(8):697–708.

Nagate, Y., Ezoe, S., Fujita, J., Okuzaki, D., Motooka, D., et al., (2021). Ectonucleotidase CD39 is highly expressed on ATLL cells and is responsible for their immunosuppressive function. *Leukemia*, 35(1):107–118.

National Multiple Sclerosis Society (NMSS), (2006), Multiple sclerosis information sourcebook. 2006; 2006 Accessed July 28, 2018 Published <https://secure.nationalmssociety.org/site/>.

O'connell, P.; Wang, X.; Leon-Ponte, M.; Griffiths, C.; Pingle, S.C.; Ahem, G.P., (2006). A novel form of immune signaling revealed by transmission of the inflammatory mediator serotonin between dendritic cells and T cells. *Blood*, 107 (3):1010–1017.

Ochoa-Repáraz, J., Kasper, L.H., (2017). The influence of gut-derived CD39 regulatory T cells in CNS demyelinating disease. *Transl Res.*, 179:126–138.

Oh, J., O'Connor, P.W., (2014). Teriflunomide in the Treatment of Multiple Sclerosis: Current Evidence and Future Prospects. *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, [S.l.], 7(5): 239–52.

Okuda, D.T., Mowry, E.M., Beheshtian, A., Waubant, E., Baranzini, S.E., et al., (2009). Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology*, 72(9):800–805.

Paintlia, M.K., Paintlia, A.S., Singh, A.K., Singh, I., (2011). Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *J. Neurochem.*, 116(4):508–521.

Palé, L.A., Caballero, J.L., Buxareu, B.S., Serrano, P.S., Solà, V.P., (2017). Systematic review of depression in patients with multiple sclerosis and its relationship to interferon β treatment. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 17:138–143.

Pariante, C.M., (2017). Why are depressed patients inflamed? A reflection on 20 years of research on depression, glucocorticoid resistance and inflammation. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 27(6):554–559.

Patten, S.B., Beck, C.A., Williams, J.V.A., et al., (2003). Major depression in multiple sclerosis. A population-based perspective. *Neurology*, 61(11):1524–7.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., et al., (2010). Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115(2):335–343.

Perriard, G., Mathias, A., Enz, L., Canales, M., Schlupe, M., et al., (2015). Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *J. Neuroinflammation*, 12:119.

Peters, A., Lee, Y., Kuchroo, V.K., (2011). The many faces of Th17 cells. *Curr Opin Immunol*, 23(6):702–706.

Piédavent-salomon, M., Willing, A., Engler, J.B., Steinbach, K., Bauer, S. et al., (2015). Multiple sclerosis associated genetic variants of CD226 impair regulatory T cell function. *Brain*, 138(Pt 11):3263-74.

Pizzagalli, D.A., (2014). Depression, stress, and anhedonia: toward a synthesis and integrated model. *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, 10:393–423.

Ponomarev, E.D., Shriver, L.P., Maresz, K., Pedras-Vasconcelos, J., Verthelvi, D., Dittel, B.N., (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 178(1):39–48.

Prat, E., Martin, R., (2002). The immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Rehabil Res Dev.*, 39(2):187-99.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Esclerose Múltipla. 2020. Relatório de recomendação nº 582. Ministério da Saúde. Brasília.

Raison, C.L., Capuron, L., Miller, A.H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, 27:24-31.

Reich, D.S., Lucchinetti, C.F., Calabresi, P.A., (2018). Multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 378(2), 169-180.

Restorick, S.M., Durant, L., Kalra, S., Hassan-Smith, G., Rathbone et al., (2017). CCR6⁺ Th cells in the cerebrospinal fluid of persons with multiple sclerosis are dominated by pathogenic non-classic Th1 cells and GM-CSF-only-secreting Th cells. *Brain, behavior, and immunity*, 64:71–79.

Robertson, M., Schacterle, R., Mackin, G., et al., (2005). Lymphocyte subset differences in patients with chronic fatigue syndrome, multiple sclerosis and major depression. *Clin Exp Immunol*, 141(2):326-32.

Roszman, T.L., Jackson, J.C., Cross, R.J., Titus, M.J., Markesbery, W.R., Brooks, W.H., (1985). Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J Immunol*, 135:769s–72s.

Sales, M.C., Kasahara, T.M., Sacramento, P.M., Rossi, A.D., Cafasso M.O.S.D., et al., (2021). Selective serotonin reuptake inhibitor attenuates the hyperresponsiveness of TLR2⁺ and TLR4⁺ Th17/Tc17-like cells in multiple sclerosis patients with major depression. *Immunology*, 162(3):290-305.

Sanofi-Genzyme, (2015). Bula profissional Aubagio. 2015. p. 1–23.

Scannevin, R.H., Chollate, S., Jung, M.Y. et al., (2012). Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther.*, 341(1):274-284.

- Schumacher, G.A., Kibler, B.G., Kurland, L.T., Kurtzke, J.F., McDowell, F., et al., (1965). Problems of experimental trials of therapy in multiple sclerosis: report by the panel on evaluation of experimental trials of therapy in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 122:552-568.
- Schumann, R., Adamaszek, M., Sommer, N., Kirkby, K.C., (2012). Stress, depression and antidepressant treatment options in patients suffering from multiple sclerosis. *Curr. Pharm. Des.*, 18(36):5837–5845.
- Scott, C.F. Jr, Cashman, N., Spitler, L.E., (1983). Experimental allergic encephalitis; treatment with drugs which alter CNS serotonin levels. *J Immunopharmacol*, 4(3):153-62.
- Setiadi, A.F., Abbas, A.R., Jeet, S., Wong, K., Bischof, A., et al., (2019). IL-17A is associated with the breakdown of the blood-brain barrier in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 332:147–154.
- Shajib, M.S., Khan, W.I., (2014). The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. *Acta Physiol. (Oxf)*. 213(3):561–574.
- Shevach, E.M., Dipaolo, R.A., Andersson, J., Zhao, D.M., Stephens, G.L., Thornton, A.M., (2006). The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol. Rev.*, 212: 60–73;
- Shi, G., Vistica, B., Lovaas, J., Tang, C., Maziz, M., Igery, I., (2010). Pathogenic or non-pathogenic subpopulations of Th17 cells are generated by stimulation of naïve CD4 cells via antigen/APC or anti-CD3/CD28 antibodies. *J Immunol*, 184:135.10.
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A. et al., (2004). Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *PNAS*, 101(8):2428–2433.
- Skurkovich, S., Boiko, A., Beliaeva, I., Buglak, A., Alekseeva, T., et al., (2001). Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF alpha in secondary progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 7(5):277–284.
- Slavich, G.M., Irwin, M.R., (2014). From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychol. Bull.*, 140(3):774–815.
- Smith, K., (2014). Mental health: a world of depression. *Nature*, 515(7526):181.
- Smith, K.J., Pyrdol, J., Gauthier, L., Wiley, D.C., Wucherpfennig, K.W., (1998). Crystal Structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med.*, 188(8):1511–20.
- Smolders, J., Thewissen, M., Peelen, E., Menheere, P., Tervaert, J.W.C. et al., (2009). Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis. *PLOS ONE*, 4: e6635.

- Snir, O., Hesselberg, E., Amoudruz, P., Klareskog, L., Zarea-Ganji, I., et al., (2013). Genetic variation in the serotonin receptor gene affects immune responses in rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity*, 14:83–89.
- Solaro, C., Gamberini, G., Masuccio, F.G., (2018). Depression in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 32(2):117-133.
- Sormani, M.P., Signori, A., Siri, P., De Stefano, N., (2013). Time to first relapse as an endpoint in multiple sclerosis clinical trials. *Mult Scler.*, 19(4):466–74.
- Sospedra, M., Martin, R., (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol.*, 23(1):683-747.
- Spiller, R., Lam, C., (2012). An Update on Post-infectious Irritable Bowel Syndrome: Role of Genetics, Immune Activation, Serotonin and Altered Microbiome. *J Neurogastroenterol Motil*, 18(3):258-68.
- Stefulj, J., Jernej, B., Cicin-Sain, L., Rinner, I., Schauenstein, K., (2000). mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain Behav. Immun.*, 14(3):219–224.
- Stys, P.K., Zamponi, G.W., van Minnen, J., Geurts, J.J., (2012). Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature reviews Neuroscience*; 13(7):507–14.
- Tagliamonte, A., Biggio, G., Vargiu, L., Gessa, G.L., (1973). Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sciences.*, 12(6):277-287.
- Talaei, F., Bouma, H.R., Van der Graaf, A.C., Strijkstra, A.M., et al., (2011). Serotonin and dopamine protect from hypothermia/rewarming damage through the CBS/H2S pathway. *PLoS One*, 6:e22568.
- Thompson, A.J., Baranzini, S.E., Geurts, J., Hemmer, B., Ciccarelli, O., (2018). Multiple sclerosis. *Lancet*, 391(10130):1622–36.
- Thompson, S., Jones, J., Cox, A., Compston, D., Coles, A., (2010). B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol.*, 30(1):99–105.
- Tsuchida, Y., Hatao, F., Fuhisawa, M., Murata, T., Kaminishi, M., et al., (2011). Neuronal stimulation with 5-hydroxytryptamine 4 receptor induces anti-inflammatory actions via $\alpha 7$ ACh receptors on muscularis macrophages associated with postoperative ileus. *Neurogastroenterology*, 60(5):638-647.
- Tynan, R.J., Weidenhofer, J., Hinwood, M., Cairns, M.J., Day, T.A., Walker, F.R., (2012). A comparative examination of the anti-inflammatory effects of SSRI and SNRI antidepressants on LPS stimulated microglia. *Brain Behav Immun*, 26(3):469-79.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., et al., (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.*, 172(1):146–155.

- Udina, M., Castellví, P., Moreno-España, J., et al., (2012). Interferon-induced depression in chronic hepatitis C: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Psychiatry*, 73(8):1128-1138.
- Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J. L., Stinissen, P., (2008). Natural Naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. *J Immunol.*, 180(9):6411-6420.
- Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., et al., (2007). Compromised CD4⁺CD25^{high} regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3⁺ positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunol.*, 123(1):79–89.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., Hafler, D.A., (2004). Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med*, 199(7):971–979.
- Vogelzangs, N., Duivis, H.E., Beekman, A.T., Kluft, C., Neuteboom, J., et al., (2012). Association of depressive disorders, depression characteristics and antidepressant medication with inflammation. *Translational psychiatry.*; 2(2):e79.
- Vojvodic, J., Mihajlovic, G., Vojvodic, P., Radomirovic, D., Vojvodic, A., et al., (2019). The Impact of Immunological Factors on Depression Treatment – Relation Between Antidepressants and Immunomodulation Agents. *Open Access Maced J Med Sci.*; 7(18):3064-3069.
- Volpe, E., Battistini, L., Borsellino, G., (2015). Advances in T helper 17 cell biology: Pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.*, 2015:475158.
- von Büdingen, H.C., Gulati, M., Kuenzle, S., et al., (2010). Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system autoimmune demyelination produce “oligoclonal bands”. *J Neuroimmunol.*; 218(1–2):134–9.
- Vosoughi, R., Freedman, M.S., (2010). Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg.*, 112(5):365–85.
- Vukovic, J., Colditz, M.J., Blackmore, D.G., Ruitenberg, M.J., Bartlett, P.F., (2012). Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging. *J. Neurosci.*, 32(19):6435–6443.
- Walther, D.J., Peter, J.U., Winter, S., Hölte, M., Paulmann, N., et al., (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*, 115(7):851–62.
- Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R., Bhutta, Z., et al., (2015). GBD 2015 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. *Lancet*, 388(10053):1459–1544.

- Wanke, F., Tang, Y., Gronke, K., Klebow, S., Moos, S., et al., (2018). Expression of IL-17F is associated with non-pathogenic Th17 cells. *J. Mol. Med.*, 96(8):819–829.
- Wanleenuwat, P., Iwanowski, P., (2019). Role of B cells and antibodies in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 36:101416.
- Watson, T.M., Ford, E., Worthington, E., Lincoln, N.B., (2014). Validation of Mood Measures for People with Multiple Sclerosis. *Int J MS Care.*, 16(2):105–109.
- Watts, S.W., Morrison, S.F., Davis, R.P., Barman, S.M., (2012). Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacological Reviews*; 64(2):359-388.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., Ramshaw, I.A., (1996). IFN γ plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 157(8):3223–3227.
- Willing, A., Jager, J., Reinhardt, S., Kursawe, N., Friese, M.A., (2018). Production of IL-17 by MAIT cells is increased in multiple sclerosis and is associated with IL-7 receptor expression. *Journal of immunology*, 200:974–982.
- Wing, A.C., Hygino, J., Ferreira, T.B., Kasahara, T.M., Barros, P.O., et al., (2016). Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients. *Immunology*, 147(2):212–220.
- Wu, H., Denna, T.H., Storkersen, J.N., Gerriets, V.A., (2018). Beyond a neurotransmitter: The role of serotonin in inflammation and immunity, *Pharmacological Research*, 140:100-114.
- Xia, Z., Depierre, J.W., Nassberger, L., (1996). Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1 β and TNF- α release in human blood monocytes and IL-2 and interferon- γ in T cells. *Immunopharmacology*, 34(1):27–37.
- Xu, W., Li, R., Dai, Y., Wu, A., Wang, H. et al., (2013). IL-22 secreting CD4⁺ T cells in the patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 261(1-2):87–91.
- Yamout, B., Alroughani, R., (2018). Multiple Sclerosis. *Seminars in Neurology*, 38(2):212–225.
- Zhang, W., Tian, X., Mumtahana, F., Jiao, J., Zhang, T. et al., (2015). The existence of Th22, pure Th17 and Th1 cells in CIN and Cervical Cancer along with their frequency variation in different stages of cervical cancer. *BMC Cancer*, 15:717.
- Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M. et al., (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol. Psychiatry*, 21(6):786–796.

Zorrilla, E.P., Luborsky, L., McKay, J.R., et al., (2001). The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun*, 15(3):199-226.

Zou, W., Feng, R., Yang, Y., (2018). Changes in the serum levels of inflammatory cytokines in antidepressant drug-naïve patients with major depression. *PLoS ONE*, 13:e0197267.

ANEXO A – Inventário de Depressão de Beck



Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro

Laboratório de Imunofisiologia e
Imunopatologia dos Linfócitos T - LILIT

INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK - BDI

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Este questionário consiste em 21 grupos de afirmações. Depois de ler cuidadosamente cada grupo, faça um círculo em torno do número (0, 1, 2 ou 3) próximo à afirmação, em cada grupo, que descreve **melhor** a maneira que você tem se sentido na **última semana, incluindo hoje**. Se várias afirmações num grupo parecerem se aplicar igualmente bem, faça um círculo em cada uma. **Tome cuidado de ler todas as afirmações, em cada grupo, antes de fazer sua escolha.**

1	0 Não me sinto triste 1 Eu me sinto triste 2 Estou sempre triste e não consigo sair disto 3 Estou tão triste ou infeliz que não consigo suportar	7	0 Não me sinto decepcionado comigo mesmo 1 Estou decepcionado comigo mesmo 2 Estou enojado de mim 3 Eu me odeio
2	0 Não estou especialmente desanimado quanto ao futuro 1 Eu me sinto desanimado quanto ao futuro 2 Acho que nada tenho a esperar 3 Acho o futuro sem esperanças e tenho a impressão de que as coisas não podem melhorar	8	0 Não me sinto de qualquer modo pior que os outros 1 Sou crítico em relação a mim por minhas fraquezas ou erros 2 Eu me culpo sempre por minhas falhas 3 Eu me culpo por tudo de mal que acontece
3	0 Não me sinto um fracasso 1 Acho que fracassei mais do que uma pessoa comum 2 Quando olho pra trás, na minha vida, tudo o que posso ver é um monte de fracassos 3 Acho que, como pessoa, sou um completo fracasso	9	0 Não tenho quaisquer idéias de me matar 1 Tenho idéias de me matar, mas não as executaria 2 Gostaria de me matar 3 Eu me mataria se tivesse oportunidade
4	0 Tenho tanto prazer em tudo como antes 1 Não sinto mais prazer nas coisas como antes 2 Não encontro um prazer real em mais nada 3 Estou insatisfeito ou aborrecido com tudo	10	0 Não choro mais que o habitual 1 Choro mais agora do que costumava 2 Agora, choro o tempo todo 3 Costumava ser capaz de chorar, mas agora não consigo, mesmo que o queria
5	0 Não me sinto especialmente culpado 1 Eu me sinto culpado grande parte do tempo 2 Eu me sinto culpado na maior parte do tempo 3 Eu me sinto sempre culpado	11	0 Não sou mais irritado agora do que já fui 1 Fico aborrecido ou irritado mais facilmente do que costumava 2 Agora, eu me sinto irritado o tempo todo 3 Não me irrita mais com coisas que costumavam me irritar
6	0 Não acho que esteja sendo punido 1 Acho que posso ser punido 2 Creio que vou ser punido 3 Acho que estou sendo punido	12	0 Não perdi o interesse pelas outras pessoas 1 Estou menos interessado pelas outras pessoas do que costumava estar 2 Perdi a maior parte do meu interesse pelas outras pessoas 3 Perdi todo o interesse pelas outras pessoas



Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro

Laboratório de Imunofisiologia e
Imunopatologia dos Linfócitos T - LIILIT

INVENTÁRIO DE DEPRESSÃO DE BECK - BDI

13	0 Tomo decisões tão bem quanto antes 1 Adio as tomadas de decisões mais do que costumava 2 Tenho mais dificuldades de tomar decisões do que antes 3 Absolutamente não consigo mais tomar decisões	18	0 O meu apetite não está pior do que o habitual 1 Meu apetite não é tão bom como costumava ser 2 Meu apetite é muito pior agora 3 Absolutamente não tenho mais apetite
14	0 Não acho que de qualquer modo pareço pior do que antes 1 Estou preocupado em estar parecendo velho ou sem atrativo 2 Acho que há mudanças permanentes na minha aparência, que me fazem parecer sem atrativo 3 Acredito que pareço feio	19	0 Não tenho perdido muito peso se é que perdi algum recentemente 1 Perdi mais do que 2 quilos e meio 2 Perdi mais do que 5 quilos 3 Perdi mais do que 7 quilos Estou tentando perder peso de propósito, comendo menos: Sim ____ Não ____
15	0 Posso trabalhar tão bem quanto antes 1 É preciso algum esforço extra para fazer alguma coisa 2 Tenho que me esforçar muito para fazer alguma coisa 3 Não consigo mais fazer qualquer trabalho	20	0 Não estou mais preocupado com a minha saúde do que o habitual 1 Estou preocupado com problemas físicos, tais como dores, indisposição do estômago ou constipação 2 Estou muito preocupado com problemas físicos e é difícil pensar em outra coisa 3 Estou tão preocupado com meus problemas físicos que não consigo pensar em qualquer outra coisa
16	0 Consigo dormir tão bem como o habitual 1 Não durmo tão bem como costumava 2 Acordo 1 a 2 horas mais cedo do que habitualmente e acho difícil voltar a dormir 3 Acordo várias horas mais cedo do que costumava e não consigo voltar a dormir	21	0 Não notei qualquer mudança recente no meu interesse por sexo 1 Estou menos interessado por sexo do que costumava 2 Estou muito menos interessado por sexo agora 3 Perdi completamente o interesse por sexo
17	0 Não fico mais cansado do que o habitual 1 Fico cansado mais facilmente do que costumava 2 Fico cansado em fazer qualquer coisa 3 Estou cansado demais para fazer qualquer coisa		

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO****Departamento de Microbiologia e Parasitologia****Laboratório de Imunofisiologia e Imunopatologia dos linfócitos T****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****Título do Projeto****“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica”****Título do SubProjeto:****“Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T de pacientes com neuromielite óptica:
comparação com a esclerose múltipla”**

Investigador Principal: Dra. Cleonice Alves de Melo Bento – Professora de Imunologia da UNIRIO.

Tels.: (21) 2531-7906/ 2558-7586 / 9883-8948

EXPLICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA AOS PARTICIPANTES**1.1- Propósito do estudo**

O propósito desse estudo é avaliar o impacto de diferentes eventos imunes em pacientes com neuromielite óptica (NMO) e compará-los com indivíduos saudáveis e com pacientes com esclerose múltipla (EM). Assim podemos identificar alguns parâmetros que possam estar implicados na NMO.

1.2- Procedimentos

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

Após a entrevista, e com o consentimento oral e por escrito do paciente, o médico irá colher o volume total de 20 mL de sangue periférico que será utilizado para realizar uma avaliação quantitativa e qualitativa de seu sistema imune.

1.3- Riscos e desconfortos

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

1.4- Benefícios

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

1.5-Alternativas para a participação

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

1.6- Custos e compensações

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

1.7- Confidenciabilidade

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

1.8- Direito para se retirar da pesquisa

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

1.9- Perguntas ou problemas

Se você tem alguma pergunta ou problema quanto a esse estudo, entre em contato com Dra. Regina Maria Papais Alvarenga ou Dra. Cleonice Alves de Melo Bento, professora e Imunologista da UNIRIOtel: 2264-2723 ou 2531-7906.

1.10- Consentimento

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

Nome do Indivíduo entrevistado:

Assinatura do Indivíduo entrevistado:

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

Nome do Investigador: _____

Assinatura do Investigador: _____

Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Data: _____