



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Anatomia Patológica

Greice Nascimento Pires

**TERAPIAS MEDICAMENTOSAS PARA A
PRESERVAÇÃO DA BAINHA DE MIELINA E A
REDUÇÃO DA SEVERIDADE DE CONVULSÕES
EM UM MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

Rio de Janeiro

2024

Greice Nascimento Pires

DRE: 119097950

**Terapias medicamentosas para a preservação da
bainha de mielina e a redução da severidade de
convulsões em um modelo animal de Esclerose
Múltipla**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina (Anatomia Patológica) como requisito para obtenção do título de Doutora em Medicina (Anatomia Patológica) na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Orientador: Prof. Dr. Henrique Rocha Mendonça. Coorientadora: Dra. Milena Batista Carneiro. Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, UFRJ.

CIP - Catalogação na Publicação

N667t Nascimento Pires, Greice
Terapias medicamentosas para a preservação da
bainha de mielina e a redução da severidade de
convulsões em um modelo animal de Esclerose
Múltipla / Greice Nascimento Pires. -- Rio de
Janeiro, 2024.
129 f.

Orientadora: Henrique Rocha Mendonça.
Coorientadora: Milena Batista Carneiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós
Graduação em Medicina (Anatomia Patológica), 2024.

1. Desmielinização. 2. Esclerose Múltipla. 3.
Excitabilidade cerebral. 4. Pranlucaste. 5.
Fingolimode. I. Rocha Mendonça, Henrique, orient.
II. Batista Carneiro, Milena, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Decania do Centro de Ciências da Saúde
Faculdade de Medicina
Direção Adjunta de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Medicina Anatomia Patológica

ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Centro de Ciências da Saúde

Faculdade de Medicina

Ata de Defesa de Tese para a concessão do grau de Doutor em Medicina

Área de Concentração: Medicina (Anatomia Patológica)

Defesa realizada no dia 09 de Setembro de 2024

Candidato: Greice Nascimento Pires

Orientadores:

1) Henrique Rocha Mendonça

Co-orientadora:

2) Milena Batista Carneiro

Banca examinadora (Nome Completo)

1) Henrique Rocha Mendonça

2) Leila Maria Cardao Chimelli

3) Pablo Trindade

4) Júlia Teixeira Oliveira

5) Soniza Vieira Alves Leon

Título da Tese:

TERAPIAS MEDICAMENTOSAS PARA A PRESERVAÇÃO DA BAINHA DE MIELINA E A REDUÇÃO DA SEVERIDADE DE CONVULSÕES EM UM MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

Local da Defesa

De acordo com a Resolução CEPG 128/2022 a defesa ocorreu de forma completamente remota através do link <https://meet.google.com/bfc-jygc-bmc>. A comissão deliberativa e a banca concordaram em realizar a defesa neste formato.

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, a candidata foi argüida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

- X APROVAÇÃO DA TESE SEM RESTRIÇÕES**
APROVAÇÃO DA TESE CONDICIONADA AO CUMPRIMENTO DE EXIGÊNCIAS FEITAS PELA BANCA (NUM PRAZO NÃO SUPERIOR A 90 (NOVENTA) DIAS)

Rio de Janeiro, 9 de Setembro de 2024

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada eletronicamente pelo presidente e demais membros da banca na ordem acima determinada e pelo candidato.

Referência: Processo nº 23079.238817/2024-26

SEI nº 4612135

Av. Pedro Calmon, 550 - Prédio da Reitoria - Bairro Cidade Universitária

Rio de Janeiro - RJ - CEP:CEP 21941-901 - Telefone: - <http://www.ufirj.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br HENRIQUE ROCHA MENDONÇA
Data: 10/09/2024 09:24:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br PABLO TRINDADE
Data: 10/09/2024 09:53:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br JULIA TEIXEIRA OLIVEIRA
Data: 10/09/2024 19:46:09-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br SONIZA VIEIRA ALVES LEON
Data: 10/09/2024 20:47:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br LEILA MARIA CARDAO CHIMELLI
Data: 11/09/2024 14:27:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
gov.br GREICE NASCIMENTO PIRES
Data: 05/11/2024 17:02:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedico esse trabalho às minhas falecidas avós que tiveram suas oportunidades de estudo oprimidas pelas mazelas sociais.

AGRADECIMENTOS

À espiritualidade por ter me guiado e abençoado diante de tantas dificuldades enfrentadas.

Aos meus pais, Maria e José, por sempre me apoiarem e por terem permitido que eu chegasse até aqui.

Ao meu companheiro de vida, Arthur Montilho, por todo o carinho e acolhimento em todos os momentos. Viver ao seu lado torna tudo muito mais leve. Obrigada por dividir a vida comigo.

Agradeço ao meu orientador, Henrique Rocha Mendonça, por ser um exemplo de ser humano e pesquisador para mim, e por ter me aceitado como aluna de doutorado. Agradeço por compartilhar, durante todos esses anos, seu conhecimento, que parece ser infinito. Mas, mais do que isso, agradeço por nunca me desamparar. Com Henrique, aprendi que as ideias mais absurdas/estranhas podem ser as mais inovadoras; aprendi a importância do acolhimento diante do erro; aprendi que a simplicidade é o melhor caminho.

Agradeço à minha coorientadora, Milena Batista Caneiro, por também ser um exemplo de pessoa para mim e por ter acompanhado e apoiado meus passos durante todos esses anos de pesquisa. Sem ela, nada disso teria acontecido. Milena é um sol que nos impulsiona a querer sempre melhorar, a buscar soluções, a não desistir diante dos problemas.

Aos meus amigos da ciência, por compartilharem seus conhecimentos, por desabafarem as dificuldades, por palavras amigas de encorajamento, e por serem meus braços e mente nos momentos de exaustão. Como sentirei saudades dos nossos experimentos em grupo. Agradeço, em especial, à minha amiga Débora Portela, que foi um presente que a pesquisa me deu desde o início em Macaé, oferecendo ajuda e me impulsionando até os últimos momentos do meu doutorado; à minha amiga Luiza Heringer, um dos tesouros mais valiosos em nossas vidas e do LNR, que sem ela tudo seria muito mais difícil ou até mesmo impossível; à minha amiga-irmã Viviane de Oliveira Souza, que entrou na minha vida na metade do doutorado para ficar, e que, sem ela, eu não teria chegado onde cheguei, principalmente depois do experimento de 48 horas sem dormir e de todas as palavras amigas; ao amigo Tiago Taboada, pelo apoio em tudo e por toda a ajuda, quase sempre imediata, até os últimos momentos.

Aos amigos de pesquisa Ana Beatriz, Saulo e Carol, por compartilharem seus conhecimentos e ajudarem sempre na expansão da nossa linha de pesquisa.

Aos colegas de laboratório: Renata Pereira Laurindo, que foi essencial na ajuda com os testes funcionais; Daniella Durço; Laura Savoldi; Givanildes; Juliana Almeida; Felipe; Emmanuela; Bryan; Bruna Ramalho; Thamyres; Ricardo; Roberta; Ana Toledo; Milena; Guilherme Santos; Domethila; Anne Caroline; Caio Prins; e Fernanda Pestana. Agradeço pelo apoio e convivência agradável.

Aos alunos de iniciação científica Davi Nunes, Júlia, Gabriel Valadares, Tais Martins, Bruno Javaroni e Pedro, pela ajuda nos detalhes e também em questões essenciais.

À professora Sheila Espírito Santo Araújo, por ser a principal responsável pela criação deste projeto. Obrigada por dividir tanto do seu conhecimento e por toda sua empatia.

Às professoras Ana Maria Blanco Martinez e Fernanda Almeida, por todo o apoio e por compartilharem seus amplos conhecimentos em pesquisa.

Às professoras Patrícia Garcez e Kátia Carneiro, por me ajudarem de braços abertos, cedendo seus laboratórios para a finalização de experimentos desesperadores.

À professora Kátia Lenzi e ao professor Marcos Santos, por me introduzirem na ciência como aluna de iniciação científica.

À Sonia, pessoa admirável e técnica de microscopia eletrônica do Serviço de Patologia da UFRJ, por me ensinar com tanto carinho, sem qualquer compromisso, sobre cortes semifinos e ultrafinos, e por me deixar confiante na técnica.

Ao Jorge, técnico do LNR, por toda ajuda no dia a dia do laboratório.

À Grazi, por toda ajuda com o microscópio confocal; à Aline, por toda ajuda com o microscópio da unidade de imagem do NUPEM; ao Daniel e ao Renan, por toda ajuda para operar o microscópio eletrônico de transmissão da CENABIO.

À Cecília, pela convivência agradável e por cuidar tão bem do nosso setor/laboratório, permitindo um ambiente organizado e limpo.

À querida Simaria, vigilante do IMCT, que nos deixou há dois anos, agradeço por toda simpatia e por sempre ter me feito companhia nas inúmeras idas ao laboratório deserto do IMCT, quando ainda estava na graduação em Medicina.

À minha segunda família, Patrícia Montilho, Hannah Montilho, Helena e Jair, por me acolherem sempre com tanto carinho.

À minha terapeuta, Marisa Nunes, por me permitir conhecer a mim mesma e, assim, melhorar como pessoa. Marisa simplesmente é capaz de transformar vidas.

Às minhas amigas de muitos anos, em especial Tayane, Larissa, Danielli, Clareana, Kelly e Keylla, e ao meu amigo Valdir, que mesmo distantes, sempre se fazem presentes através de mensagens ou ligações de carinho.

À Minnie May, minha cadela, por sempre me trazer alegria.

A todos os amigos e familiares que não foram citados, mas com quem pude compartilhar este caminho do doutorado, obrigada por estarem sempre na minha torcida.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa do doutorado, por aceitarem participar deste momento e por contribuírem para a finalização deste trabalho.

Às agências de fomento à pesquisa, CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

"A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

RESUMO

A mielina é essencial para o funcionamento adequado do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos, garantindo a condução adequada dos impulsos elétricos. Alterações em sua estrutura podem levar a doenças incapacitantes como a Esclerose Múltipla (EM). A EM pode levar à epilepsia, sugerindo que lesões desmielinizantes podem se relacionar à excitabilidade anormal e convulsões, associadas à diminuição da função cognitiva e rápida incapacidade dos pacientes. Poucas pesquisas existem investigando a patogênese dessa relação e como impedir o aumento da excitabilidade. Este trabalho visa investigar o efeito do pranlucaste ou fingolimode na proteção contra desmielinização e hiperexcitabilidade cerebral em um modelo animal de EM. Para isso, camundongos suíço adultos jovens foram tratados por cinco semanas com dieta em pó que continha ou não cuprizona (CPZ) 0,2% e com injeções intraperitoneais diárias com pranlucaste (0,1 mg/kg), fingolimode (1mg/kg) ou veículo. O tratamento com pranlucaste não mostrou ter um efeito robusto na preservação da mielina, já que não protegeu contra a perda de lipídeos da mielina, de oligodendrócitos maduros, do número de fibras mielínicas ou do número de fibras com a razão-g na faixa ideal no corpo caloso (CC), diferentemente da proteção/remielinização observada após tratamento com fingolimode. Entretanto, assim como o fingolimode, o pranlucaste preservou parcialmente a função sensitiva no teste de sensibilidade tátil, além de diminuir significativamente o tempo de duração das convulsões na fase 6 da escala de Racine modificada, sugerindo recuperação sensitiva e proteção contra a hiperexcitabilidade cerebral. Ambos os tratamentos diminuíram a concentração de potássio extracelular, o que pode estar relacionado à redução de descargas neuronais anormais. A melhora funcional e de excitabilidade promovida pelo fingolimode ocorre concomitante à preservação da mielina. Além disso, a proteção contra a perda dos canais Nav1.6 aponta para preservação da característica de nodos de Ranvier de fibras nervosas saudáveis. Já em relação ao tratamento com pranlucaste essa melhora parece estar associada a outros mecanismos não investigados no presente estudo. Em suma, este trabalho permitiu investigar os efeitos do pranlucaste, ainda não usado na EM, e do fingolimode, já aplicado como opção de tratamento da EM, na mielinização e na probabilidade de convulsões, oferecendo subsídios para uma melhor escolha clínica do tratamento de pacientes que apresentem diferentes aspectos patológicos da doença.

Palavras-chave: Mielina, desmielinização, excitabilidade cerebral, Esclerose Múltipla, Pranlucaste, Fingolimode.

ABSTRACT

Myelin is essential for the proper functioning of the central nervous system (CNS) in mammals, ensuring the appropriate conduction of electrical impulses. Alterations in its structure can lead to disabling diseases such as Multiple Sclerosis (MS). MS can lead to epilepsy, suggesting that demyelinating lesions may be related to abnormal excitability and seizures, associated with decreased cognitive function and rapid disability in patients. Few studies have investigated the pathogenesis of this relationship and how to prevent the increase in excitability. This study aims to investigate the effect of pranlukast or fingolimod on protection against demyelination and cerebral hyperexcitability in an animal model of MS. For this purpose, young adult Swiss mice were treated for five weeks with a powdered diet containing or not containing 0.2% cuprizone (CPZ) and with daily intraperitoneal injections of pranlukast (0.1 mg/kg), fingolimod (1 mg/kg), or vehicle. Pranlukast treatment did not show a robust effect on myelin preservation, as it did not protect against the loss of myelin lipids, mature oligodendrocytes, the number of myelinated fibers, or the number of fibers with the g-ratio in the optimal range in the corpus callosum (CC), unlike the protection/remyelination observed after fingolimod treatment. However, like fingolimod, pranlukast partially preserved sensory function in the tactile sensitivity test and significantly reduced seizure duration in phase 6 of the modified Racine scale, suggesting sensory recovery and protection against cerebral hyperexcitability. Both treatments decreased extracellular potassium concentration, which may be related to the reduction of abnormal neuronal discharges. The functional and excitability improvements promoted by fingolimod occur concomitant with myelin preservation, and additionally, the protection against the loss of Nav1.6 channels points to the preservation of the nodal characteristics of healthy nerve fibers. In relation to pranlukast treatment, this improvement seems to be associated with other mechanisms not investigated in the present study. In summary, this work allowed for the investigation of the effects of pranlukast, not yet used in MS, and fingolimod, already applied as a treatment option for MS, on myelination and seizure likelihood, providing insights for better clinical treatment choices for patients presenting different pathological aspects of the disease.

Keywords: Myelin, demyelination, brain excitability, Multiple Sclerosis, Pranlukast, Fingolimod.

LISTA DE ABREVIACÕES

| | |
|--------|---|
| AIS | Segmento inicial do axônio |
| AS | Astrócito |
| BBB | Barreira hematoencefálica |
| CC | Corpo caloso |
| CPZ | Cuprizona |
| DMTs | Tratamentos modificadores de doença |
| EAE | Encefalite experimental autoimune |
| EM | Esclerose Múltipla |
| GA | Glutaraldeído |
| HE | Hematoxilina e eosina |
| Kv | Canais de potássio dependentes de voltagem |
| LT | Leucotrieno |
| LTP | Potenciação de longo prazo |
| MAG | Glicoproteína associada à mielina |
| MBP | Proteína básica de mielina |
| ME | Microscopia eletrônica |
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| MOG | Glicoproteína da mielina de oligodendrócitos |
| Nav | Canais de Na ⁺ dependentes de voltagem |
| Nav1.2 | Canais de sódio dependentes de voltagem do tipo 1.2 |
| Nav1.6 | Canais de sódio dependentes de voltagem do tipo 1.6 |

| | |
|-------|---|
| NG2 | Antígeno glial neuronal 2 |
| NMDAR | Receptor N-metil-D-aspartato |
| OLs | Oligodendrócitos |
| OPCs | Células precursoras de oligodendrócitos |
| PA | Potencial de ação |
| PBS | Salina tamponada com fosfato |
| PFA | Paraformaldeído |
| PLP | Proteína proteolípídica |
| PTZ | Pentilenotetrazol |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| SDS | Sulfato dodecil de sódio |
| SN | Sistema nervoso |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SNP | Sistema Nervoso Periférico |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 1: | Ultraestrutura de uma fibra mielínica e representação esquemática de componentes lipídicos e proteicos da mielina | 27 |
| Figura 2: | Ilustração esquemática do nodo de Ranvier, paranodo e justaparanodo | 30 |
| Figura 3: | Representação da proposta de remielinização a partir de oligodendrócitos preexistentes à lesão | 33 |
| Figura 4: | Ilustração esquemática mostrando o clearance de íons K^+ | 34 |
| Figura 5: | Ilustração esquemática mostrando um oligodendrócito mielinizando vários axônios, formando as regiões internodais em situações fisiológicas | 36 |
| Figura 6: | Alterações em língua interna | 37 |
| Figura 7: | Ilustração esquemática mostrando a fragmentação da mielina nos estágios iniciais da desmielinização | 38 |
| Figura 8: | Ilustração esquemática mostrando os principais tipos de comunicação intercelular no SNC | 43 |
| Figura 9: | Fases da Escala de Racine modificada observada nos animais | 58 |
| Figura 10: | Análise da variação ponderal em relação ao início do tratamento dos animais | 68 |
| Figura 11: | Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso quanto à densidade de fluoromielina, de coloração por Sudan Black e de MBP | 70 |
| Figura 12: | Cortes semifinos parassagitais do corpo caloso de cada grupo, mostrando as fibras mielínicas em cada respectivo grupo | 71 |
| Figura 13: | Cortes ultrafinos parassagitais do corpo caloso de cada | 73 |

grupo, mostrando as fibras mielínicas e sem mielina (amielínicas e desmielinizadas)

| | | |
|------------|--|----|
| Figura 14: | Análise de anormalidades de mielina | 75 |
| Figura 15: | Análise estatística da razão-g, área do axônio, área da mielina e área das fibras. | 77 |
| Figura 16: | Teste de Pressão Crescente na Pata (Analgésímetro Digital) | 78 |
| Figura 17: | Quantificação das crises convulsivas analisadas pela Escala de Racine modificada. | 80 |
| Figura 18: | Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso coradas com HE | 81 |
| Figura 19: | Imunofluorescência anti-CC1 | 83 |
| Figura 20: | Imunofluorescência anti-NG2 | 84 |
| Figura 21: | Dosagem de íons potássio por meio de cultura organotípica | 85 |
| Figura 22: | Imunofluorescência anti-Nav1.6 | 87 |
| Figura 23: | Análise dos baços | 89 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1: | Especificação de anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica. | 60 |
| Tabela 2: | Especificação de anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica. | 61 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | | |
|------------|---------------------------------|----|
| Esquema 1: | Desenho do modelo experimental. | 57 |
|------------|---------------------------------|----|

SUMÁRIO

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 | Mielina | 23 |
| 1.2 | Organização e morfologia das fibras mielínicas | 26 |
| 1.2.1 | Variações morfológicas e suas relações com a funcionalidade das fibras mielínicas | 30 |
| 1.3 | Células Progenitoras de Oligodendrócitos e Oligodendrócitos | 32 |
| 1.4 | Desmielinização e anormalidades de mielina | 34 |
| 1.5 | Potencial de ação na desmielinização | 38 |
| 1.5.1 | Potássio extracelular e sua relação com a hiperexcitabilidade cerebral | 42 |
| 1.6 | Doenças desmielinizantes e distúrbios de excitabilidade | 44 |
| 1.6.1 | Esclerose Múltipla e hiperexcitabilidade cerebral | 46 |
| 1.6.2 | Cuprizona como modelo de desmielinização no Sistema Nervoso Central | 48 |
| 1.7 | Tratamento na Esclerose Múltipla | 50 |
| 1.8 | Justificativa | 53 |
| 2. | OBJETIVO GERAL | 54 |
| 2.1 | Objetivos Específicos | 54 |
| 3. | MATERIAIS E MÉTODOS | 56 |
| 3.1 | Animais | 56 |
| 3.2 | Dieta com Cuprizona | 56 |
| 3.3 | Tratamento com Pranluaste ou Fingolimode | 56 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.4 | Teste funcional | 57 |
| 3.5 | Verificação da predisposição a convulsões | 58 |
| 3.6 | Imuno-histoquímica para marcadores específicos | 58 |
| 3.7 | Coloração com Fluoromielina | 61 |
| 3.8 | Coloração com Sudan Black | 61 |
| 3.9 | Coloração com Hematoxilina e Eosina | 62 |
| 3.10 | Processamento dos baços e coloração em Hematoxilina e Eosina | 62 |
| 3.11 | Microscopia Eletrônica de Transmissão | 63 |
| 3.12 | Cultura organotípica | 65 |
| 3.13 | Dosagem da concentração de íons K ⁺ por potenciometria | 66 |
| 3.14 | Análise estatística | 66 |
| 4. | RESULTADOS | 67 |
| 4.1 | Variação ponderal em relação ao início do tratamento dos animais | 67 |
| 4.2 | Dieta com 0,2% de cuprizona induziu a desmielinização no corpo caloso e o tratamento com pranlucaste ou fingolimode protegeram contra a desmielinização | 68 |
| 4.3 | Dieta com 0,2% de cuprizona e o tratamento com fingolimode diminuiu e preservou respectivamente, o número de fibras mielínicas no corpo caloso | 71 |
| 4.4 | Dieta com 0,2% de cuprizona levou a um aumento no número de anormalidades de mielina no corpo caloso | 74 |
| 4.5 | Dieta com 0,2% de cuprizona diminuiu e o tratamento com fingolimode preservou o número de fibras com a razão-g na faixa ideal | 75 |
| 4.6 | Dieta com 0,2% de cuprizona gerou déficits de sensibilidade tátil nos camundongos, enquanto os tratamentos com pranlucaste ou fingolimode protegeram parcialmente contra distúrbios sensoriais | 78 |
| 4.7 | A desmielinização do corpo caloso prolongou a duração da convulsão em camundongos, enquanto os tratamentos com pranlucaste ou fingolimode protegeram contra a hiperexcitabilidade cerebral | 79 |
| 4.8 | Dieta com 0,2% de cuprizona levou a uma desorganização da citoarquitetura do corpo caloso | 80 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4.9 | Dieta com 0,2% de cuprizona diminuiu o número de oligodendrócitos, enquanto o tratamento com pranlucaste ou fingolimode não protegeram contra a perda dessas células no corpo caloso | 82 |
| 4.10 | Dieta com 0,2% de cuprizona aumentou o número de progenitores de oligodendrócitos no corpo caloso, o que não ocorreu após tratamento com pranlucaste ou fingolimode | 83 |
| 4.11 | O tratamento com pranlucaste ou fingolimode diminuiu a concentração de íons de potássio extracelular em ensaio de cultura organotípica | 84 |
| 4.12 | Dieta com 0,2% de cuprizona levou à redução de canais Nav1.6 e o tratamento com fingolimode protegeu contra essa redução ao contrário do tratamento com pranlucaste | 86 |
| 4.13 | Dieta com 0,2% de cuprizona e o tratamento com pranlucaste diminuiu o peso dos baços | 88 |
| 5. | DISCUSSÃO | 91 |
| 5.1 | Os tratamentos com pranlucaste e fingolimode mostraram efeitos protetores contra a desmielinização induzida por cuprizona, permitindo a recuperação do peso dos animais | 91 |
| 5.2 | O tratamento com fingolimode demonstrou ser mais eficiente na preservação da estrutura da mielina em comparação com o pranlucaste | 92 |
| 5.3 | A intoxicação com cuprizona 0,2% gerou uma diminuição no número oligodendrócitos e de fibras mielínicas, além de um aumento no número de anormalidades de mielina e na hiperexcitabilidade | 93 |
| 5.4 | O tratamento com fingolimode protegeu parcialmente contra a perda de fibras mielínicas, além de ter impedido o aumento de anormalidades de mielina e a hiperexcitabilidade cerebral | 96 |
| 5.5 | O tratamento com pranlucaste não impediu a perda de fibras mielínicas, mas protegeu contra o aumento de anormalidades de mielina e contra a hiperexcitabilidade cerebral | 99 |
| 5.6 | A dieta com cuprizona 0,2% levou a um aumento significativo de células progenitoras de oligodendrócitos, o que não foi visto nos tratamentos com fingolimode ou pranlucaste | 101 |
| 5.7 | O tratamento com fingolimode preservou um maior número de fibras com a razão-g na faixa ideal, mas ambos os tratamentos protegeram parcialmente contra a diminuição da sensibilidade tátil | 103 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 5.8 | O tratamento com pranlucaste ou fingolimode diminuiu a concentração de íons K^+ extracelular, mas teve efeitos distintos nos segmentos excitáveis de axônio | 106 |
| 5.9 | A dieta com cuprizona 0,2% reduziu o peso dos baços, assim como o tratamento com pranlucaste | 109 |
| 6. | CONCLUSÃO | 112 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 114 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mielina

A mielina do sistema nervoso central (SNC) é uma membrana celular alterada de oligodendrócitos (OLs) que envolvem o axônio, formando uma bainha multilamelar (KISTER e KISTER, 2023 para revisão). Assim como todas as membranas celulares, a bainha de mielina é constituída por três componentes principais: água, lipídios e proteína (figura 1). Entretanto, a proporção desses componentes na mielina é diferente da presente nas outras membranas celulares (STADELMANN et al., 2019; KISTER e KISTER, 2023). A bainha de mielina seca é formada por uma alta proporção de lipídeos (70 - 85%) e uma baixa proporção de proteínas (15 – 30%), diferente do que ocorre com outras membranas celulares que possuem uma quantidade de lipídeos (50%) e proteínas (50%) aproximadamente igual (POITELON, KOPEC e BELIN, 2020). Quanto aos mais abundantes componentes lipídicos da estrutura da bainha de mielina, observa-se uma distribuição de 40% de colesterol, 40% de fosfolipídios e 20% de glicolipídios. Esta proporção contrasta com a maioria das membranas biológicas, onde a distribuição é mais próxima de 25%:65%:10%, respectivamente (POITELON, KOPEC e BELIN, 2020). Pequenas alterações na composição lipídica da mielina são capazes de causar uma destruição das estruturas da mielina, culminando em doenças neurológicas graves (CHRAST et al., 2011; LAMARI et al., 2013).

O colesterol é importante para reduzir a penetração de água, gases (por exemplo, oxigênio) e pequenas moléculas neutras (por exemplo, glicose) através da membrana (SHINODA, 2016; OLŻYŃSKA et al., 2020), além de ser determinante para a fluidez da membrana (KISTER e KISTER, 2023 para revisão) e ter relação com o processo de reparo da mielina, já que este é mais eficiente quando a taxa de síntese de colesterol é aumentada (BERGHOFF et al., 2021).

Quanto aos fosfolipídios, duas das principais classes de fosfolipídios de membrana - esfingomielina e fosfatidilcolina - constituem mais de 50% dos fosfolipídios de membrana. Eles são importantes para diminuir a fluidez da associação lipídica e para fornecer uma barreira menos permeável para íons, permitindo um melhor isolamento dos axônios (CHRAST et al., 2011; MONTANI, 2021)

Os glicolipídios interagem com fosfolipídios e colesterol para induzir a compactação densa na bicamada da membrana da mielina. A disposição assimétrica de fosfolipídios e glicolipídios é observada na membrana, com predominância de fosfolipídios na folha interna da bicamada lipídica e de glicolipídios na folha externa (STOFFEL e BOSIO, 1997). A deficiência de glicolipídeos prejudica o empacotamento da bicamada lipídica, aumenta a permeabilidade da membrana e causa a interrupção da condutância dos axônios mielinizados. Devido à importância dos glicolipídeos para a função adequada da mielina, há um aumento de duas vezes na proporção de glicolipídios na mielina em comparação com as outras biomembranas (KISTER e KISTER, 2023).

A mielina contém domínios lipídicos dinâmicos no folheto externo da membrana plasmática chamados balsas lipídicas (GIELEN et al., 2006; DUPREE e POMICTER, 2010), com altos níveis de colesterol, galactosilceramida (ou galactocerebrosídeo) e baixos níveis de fosfatidilcolina, sendo importantes na formação e estabilização da mielina (SIMONS et al., 2000; DECKER e FFRENCH-CONSTANT, 2004).

A composição lipídica entre a mielina do SNC e do Sistema Nervoso Periférico (SNP) é notavelmente semelhante, com exceção dos níveis de fosfatidilcolina e esfingomielina, que são relativamente abundantes na bainha de mielina periférica em comparação com a bainha de mielina central (POITELON, KOPEC e BELIN, 2020 para revisão).

A mielina contém uma quantidade relativamente pequena de proteínas, porém elas formam um grupo altamente diverso (JAHN et al., 2020). Essas proteínas se diferenciam quanto às sequências, funções e estruturas, mas compartilham algumas características comuns: são tipicamente pequenas, têm meias-vidas longas e são multifuncionais (KISTER e KISTER, 2023).

A proteína proteolipídica (PLP) é a proteína de mielina mais abundante no SNC, constituindo 38% da massa proteica total da mielina (JAHN et al., 2020). Um alto nível de PLP na mielina é necessário para preservar a integridade da mielina. A PLP atua na compactação da multicamada de mielina, aproximando as membranas de mielina umas das outras. Uma redução no conteúdo de PLP em 50% causa alteração da ultraestrutura da mielina e patologia axonal (LÜDERS et al., 2019).

A proteína básica de mielina (MBP) é a segunda proteína mais abundante do SNC, contribuindo para cerca de 30% da massa proteica total da mielina (JAHN et al., 2020). Ela interage com outras proteínas associadas à membrana e relacionadas à expressão proteica, desempenhando um papel regulatório na mielinogênese (SMIRNOVA et al., 2021), e com lipídios – um teor de colesterol de 44% na mielina permite uma interação termodinamicamente mais favorável com a MBP, sendo ideal para compactação da membrana e estabilidade termodinâmica (TRÄGER et al., 2020). A MBP é importante na participação da transmissão do sinal extracelular para as junções de oclusão e para o citoesqueleto (BOGGS, 2006), além de um papel crítico na compactação da bainha de mielina (MOSCARELLO, 1997). Várias pesquisas têm sido realizadas para investigar o papel da MBP como fonte de epítomos autoantigênicos na EM (MARTINSEN e KURSULA, 2022). Foi visto que há mudanças na composição e na estrutura da MBP, bem como na mielina compacta, durante a patogênese da EM (WOOD et al., 1996; BENIAC et al., 1999; BOGGS et al., 1999). Outro epítomo antigênico conhecido da EM é a Proteína Básica Oligodendrocítica Associada à Mielina (MOBP) (HOLZ et al., 2000) que tem função pouco compreendida (MONTAGUE et al., 2006).

A CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase) é uma proteína específica de OLs previamente implicada na manutenção da integridade axonal (LAPPE-SIEFKE et al., 2003). Foi visto que ela antagoniza a atividade da MBP, evitando a compactação excessiva da mielina, associando-se e organizando o citoesqueleto dentro das regiões citoplasmáticas da bainha de mielina, mantendo os folhetos citoplasmáticos adjacentes separados (SNAIDERO et al., 2017). É provável que a manutenção desses espaços citoplasmáticos abertos permita uma difusão mais eficiente de metabólitos e moléculas através da bainha de mielina para o axônio (SNAIDERO et al., 2017).

A glicoproteína da mielina de oligodendrócitos (MOG) é menos abundante que as proteínas citadas anteriormente, mas tem grande relevância clínica e para a pesquisa, já que a injeção de peptídeos MOG e adjuvantes em animais de laboratório foi capaz de gerar desmielinização característica do modelo experimental de EM denominada encefalite autoimune experimental (EAE) (LONGBRAKE, 2022).

A glicoproteína associada à mielina (MAG) compreende uma pequena porcentagem (< 1%) de todas as proteínas que compõe a mielina (TRAPP, 1990). Essa proteína posiciona-se na face interna da bainha de mielina, sendo restrita à membrana adjacente ao espaço adaxonal e

permitindo a ligação da bainha de mielina a seus receptores GD1a e GT1b (LAULE; MOORE, 2018) (Figura 1). Ela é importante para manutenção axonal já que experimentos com camundongos com deleção genética de MAG desenvolveram perda axonal no SNC e SNP. (YIN et al., 1998; PAN et al., 2005).

Atualmente é evidente que, além de funcionar como membrana inerte e isolante, a mielina é metabolicamente ativa, proporcionando suporte ao axônio subjacente (FÜNFSCILLING et al., 2012; LEE et al., 2012; SAAB et al., 2016). Além disso, observou-se o crescimento da mielina em resposta à atividade neuronal, o que pode influenciar o processamento de informações ao modular a velocidade e a sincronicidade dos impulsos nervosos (CHANG, REDMOND e CHAN, 2016).

1.2 Organização e morfologia das fibras mielínicas

Além do conhecimento sobre a composição da bainha de mielina, o estudo sobre a morfologia das fibras mielínicas é importante para a investigação realizada neste trabalho e fundamental no estudo de doenças neurodegenerativas, como a EM, e da remielinização que estão diretamente relacionadas com alterações na estrutura da mielina (PÉRIER e GRÉGOIRE, 1965).

Desde a década de 1950, a microscopia eletrônica (ME) é uma ferramenta essencial para os neuropatologistas, possibilitando o estudo da ultraestrutura da mielina (BUNGE, BUNGE e PAPPAS, 1962; BUNGE, BUNGE e PETERSON, 1965; BUNGE et al., 1967; MRAK, 2002; HIRANO, 2005; BERCURY e MACKLIN, 2015). Os primeiros estudos de ME mostraram que a mielinização resultava do giro interno da bainha membranosa do OL estendendo-se em um movimento concêntrico e lateral pelo axônio (ver BERCURY e MACKLIN, 2015 para revisão). Esse processo de mielinização envolve uma sequência complexa de eventos que se inicia pela migração de células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) da zona ventricular / subventricular do encéfalo para a substância branca em desenvolvimento para formarem redes, uniformemente espaçadas, de células com vários prolongamentos. Enquanto ocorre a migração para o estabelecimento da posição final, as OPCs continuamente expandem e retraem seus numerosos prolongamentos exploratórios (KIRBY et al., 2006; HUGHES et al., 2013). Ao chegarem ao seu destino final, uma parte das OPCs permanecem em estado de precursor e a outra parte se diferencia em OLs formadores de mielina (ver SIMONS e NAVE, 2016 para revisão)

A morfologia das fibras mielínicas na ME pode ser visualizada como várias camadas alternadas de elétrons densos e leves, formando a linha densa principal e a linha intraperiódica (STADELMANN et al., 2019b). A linha densa principal indica as superfícies citoplasmáticas de OLs que estão estreitamente condensadas, ao passo que a linha intraperiódica é composta pelas membranas externas que estão firmemente sobrepostas (AGGARWAL, YURLOVA e SIMONS, 2011), conferindo à mielina sua aparência ultraestrutural característica (Figura 1).

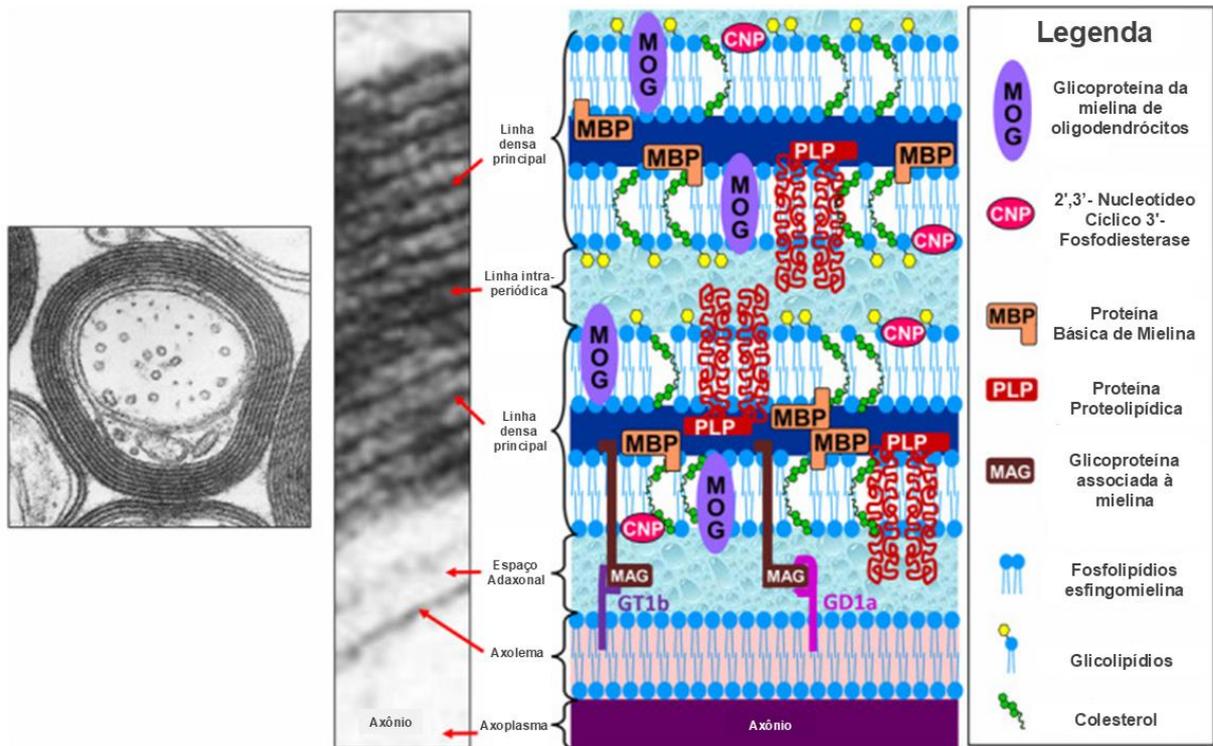


Figura 1. Ultraestrutura de uma fibra mielínica e representação esquemática de componentes lipídicos e proteicos da mielina. Micrografia eletrônica mostrando a ultraestrutura de uma fibra mielínica do SNC à esquerda com alta ampliação visualizada na imagem central que mostra as linhas densas principais, as linhas intraperiódicas, o espaço adaxonal, o axolema e o axoplasma. A imagem esquemática à direita mostra a organização dos componentes da mielina como a MBP, a PLP, a CNPase, a MOG e a MAG (imagem retirada e modificada de LAULE; MOORE, 2018).

Apesar da mielina ter sido considerada por muito tempo como uma estrutura isolante inerte, conforme já descrito, evidências mais recentes demonstram que a mielina é uma estrutura metabolicamente ativa. Isso é possível principalmente pela comunicação entre glia e axônio permitida pelos canais mielínicos ou incisuras de Schmidt-Lanterman que consistem na porção não compacta (Figura 5) do prolongamento celular do OL que permite o movimento de macromoléculas para o espaço periaxonal. (VELUMIAN, SAMOILOVA e FEHLINGS, 2011; SIMONS e NAVE, 2016; STASSART et al., 2018). Existem também outras porções de mielina

não compactada que caracterizam as línguas internas e externas de mielina (Figura 7A) e as alças paranodais (Figura 5) (AGGARWAL, YURLOVA e SIMONS, 2011). Os OLs se conectam com astrócitos ou entre si por meio de junções comunicantes, formando uma rede funcional na substância branca que é semelhante a um sincício glial (SIMONS; NAVE, 2016).

Além dos internodos, porção mielinizada dos axônios descrita anteriormente, as fibras mielínicas têm regiões especializadas distintas que são fundamentais para a propagação eficiente do potencial de ação (PA): nodos de Ranvier, paranodos e justaparanodos (ISHIBASHI e BABA, 2022) (Figura 2).

Os nodos de Ranvier correspondem a regiões axonais curtas não mielinizadas que servem para a geração de potenciais de ação; morfologicamente, correspondem a uma lacuna flanqueada pelos internodos. Os nodos de Ranvier geralmente têm aproximadamente 1 μm de comprimento e são ricos em canais de sódio dependentes de voltagem, como os canais de sódio dependentes de voltagem do tipo 1.6 (Nav1.6) (DUMÉNIÉU et al., 2017 para revisão; STASSART et al., 2018). Esses canais de sódio se ligam à anquirina G que se conecta ao citoesqueleto via espectrina βIV . Outras proteínas presentes na membrana axonal dos nodos de Ranvier incluem as ATPases Na^+/K^+ , NrCAM e neurofascina (LEMAILLET; WALKER; LAMBERT, 2003; DENISENKO-NEHRBASS et al., 2003; COMAN et al., 2006).

Os paranodos correspondem às regiões em cada extremidade do internodo em que as alças paranodais não compactadas da bainha de mielina se ancoram ao axônio, ricas em moléculas de adesão celular como CASPR1/paranodina e contactina 1 que ficam ancoradas ao citoesqueleto de actina via proteína 4.1B (DENISENKO-NEHRBASS et al., 2003; ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014). Essas junções adesivas paranodais formam uma barreira ao fluxo de correntes iônicas entre os canais de sódio dependentes de voltagem abundantes nos nodos e os canais de potássio retificadores tardios abundantes na região justaparanodal, possibilitando uma organização fundamental para a despolarização e repolarização celular. Além disso, as junções paranodais atuam como barreiras, impedindo a entrada de moléculas no espaço peri-axonal, e servem como locais de comunicação entre os OLs e os axônios. (WOLSWIJK, 2003).

Os justaparanodos são as regiões mais próximas dos paranodos, que abrigam canais de potássio dependentes de voltagem (Kv) em grande abundância, como Kv1.1 e Kv1.2, assim como

moléculas de adesão celular como a CASPR2 (DUMÉNIÉU et al., 2017 para revisão; STASSART et al., 2018). Esta é uma proteína transmembrana presente na região justaparanodal, pertencente à superfamília das neurexinas, que medeia as interações celulares. A CASPR2 está precisamente colocalizada com canais de potássio no justaparanodo e se associa a esses canais (Kv1.1 e Kv1.2) por meio de sua sequência C-terminal (POLIAK et al., 1999). Assim, a CASPR2 tem um papel crítico em concentrar e posicionar corretamente os canais de potássio dependentes de voltagem na região justaparanodal dos axônios mielinizados (ZOU et al., 2017).

O acúmulo de canais de Kv1 na região justaparanodal depende da presença de Caspr2 neste local, bem como da presença de Caspr1 na junção paranodal adjacente, o que foi mostrado com a exclusão simultânea de Caspr1 e Caspr2 interrompendo a organização internodal de Kv1.2 (GORDON et al., 2014).

Na extremidade proximal dos axônios mielinizados encontra-se uma estrutura especializada e não mielinizada denominada segmento inicial do axônio (AIS), que é responsável por gerar e moldar o PA antes que ele seja propagado ao longo do axônio (LETERRIER, 2018).

A excitabilidade dos neurônios é fortemente influenciada pela estrutura e posição do AIS, que se ajustam em resposta às mudanças nas condições fisiológicas e ao processo de desenvolvimento (LETERRIER, 2018). Assim, o AIS é densamente povoado por canais iônicos, como os canais de sódio dependentes de voltagem e os canais de potássio KCNQ, possuindo um arcabouço semelhante ao dos nodos de Ranvier (DUMÉNIÉU et al., 2017 para revisão).

Diante do arcabouço estrutural das fibras mielínicas, observa-se que a presença da integridade da mielina, com preservação das regiões de paranodo e justaparanodo, é crucial para a geração e propagação de PA de forma adequada (WOLSWIJK, 2003).

Em modelos experimentais de desmielinização, sabe-se que os canais iônicos dependentes de voltagem nos nodos e justaparanodos difundem-se lateralmente e podem se estender para as regiões internodais anteriormente mielinizadas. Acredita-se que essas reorganizações dos canais iônicos dependentes de voltagem ajudam a compensar, parcialmente, a perda da condução saltatória e a redução na velocidade de propagação do PA nos axônios da

substância branca, entretanto, podem estar relacionados à hiperexcitabilidade (HAMADA; KOLE, 2015).

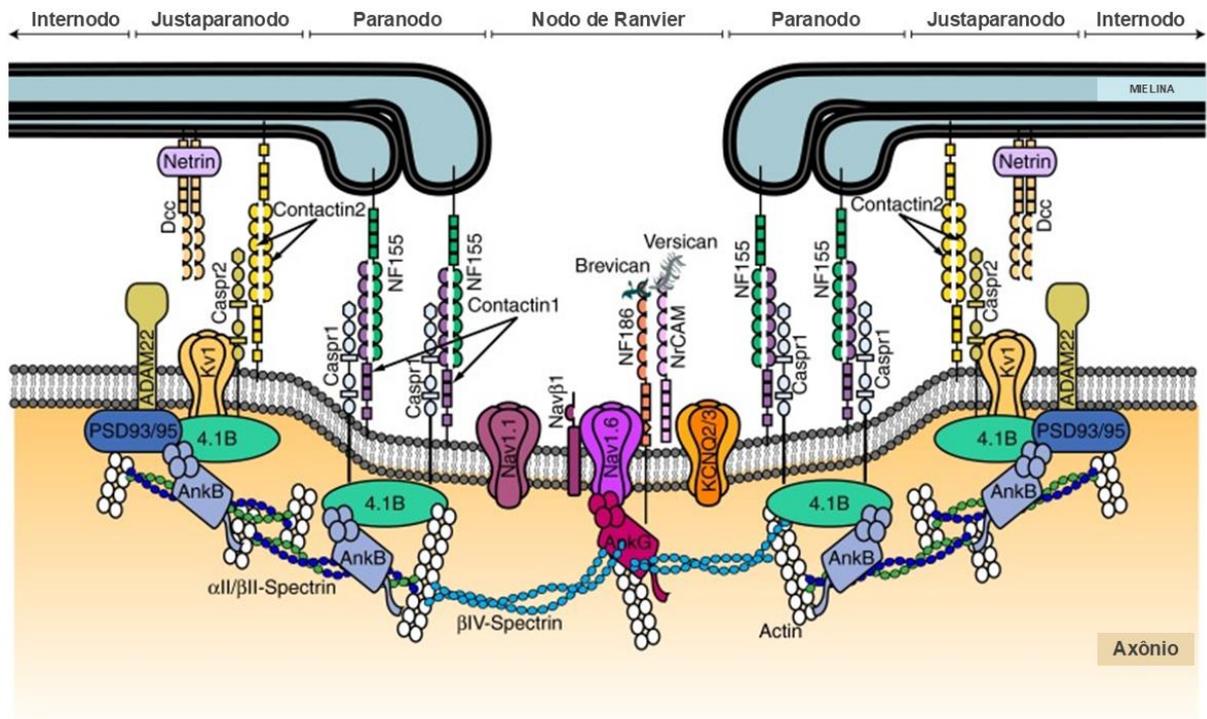


Figura 2. Ilustração esquemática do nó de Ranvier, paranodo e justaparanodo. Observe que cada região possui canais iônicos e proteínas de ancoramento específicas de cada domínio, formando um arcabouço estrutural característico (imagem retirada e modificada de ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014).

1.2.1 Variações morfológicas e suas relações com a funcionalidade das fibras mielínicas

A mielinização pode impactar significativamente tanto na estrutura quanto na fisiologia de um axônio e seu tecido circundante, pois à medida que mais mielina é adicionada a um axônio, a bainha se torna mais espessa e passa a ocupar uma proporção maior do volume ao redor do axônio, alterando as propriedades biofísicas que determinam a função axonal, por exemplo facilitando o fluxo iônico longitudinal pelo axônio, ao afastar o campo elétrico dos íons extracelulares (CHOMIAK; HU, 2009; FRANSSEN, 2019). Além disso, as propriedades de condução do PA também são influenciadas pelo calibre do axônio, comprimento internodal e estrutura molecular dos nodos de Ranvier (PERROT et al., 2007; ALCAMI, EL HADY, 2019). Portanto, a análise dessas alterações e assim como as da mielina auxiliam na compreensão da excitabilidade cerebral.

As fibras mielínicas desenvolvem relações estereotipadas entre o calibre do axônio, a

espessura da mielina e as distâncias internodais. Com o aumento dos calibres dos axônios, as bainhas de mielina são proporcionalmente mais espessas e longas (PERROT et al., 2007), o que é decisivo para a determinação da velocidade de condução do impulso elétrico. Estudos mostraram que os axônios do SNC possuem diversas velocidades de condução e que a mielinização influencia nessa variedade. Assim, os axônios podem utilizar a mielinização como mecanismo adaptativo para garantir uma transmissão do PA de forma mais eficiente e energeticamente favorável. Porém, com a hipermielinização de determinadas fibras em alguns contextos há uma expansão espacial que influencia o sistema como um todo, uma vez que os demais elementos celulares são estimulados a mudarem suas propriedades morfológicas para se adaptarem a um menor espaço disponível. O equilíbrio organizacional se dá por meio de propriedades elétricas e bioquímicas intrínsecas do próprio axônio e pela comunicação axo-glial (CHKLOVSKII, SCHIKORSKI, STEVENS, 2002; CHOMIAK, HU, 2009).

Uma forma de analisar o equilíbrio e a otimização da organização estrutural e funcional das fibras mielínicas se dá por meio da razão-g, definida pela razão entre o diâmetro da fibra e o diâmetro do axônio isolado, que é sempre menor que 1. Ela é um parâmetro altamente confiável para avaliar a mielinização do axônio e é calculada medindo-se a circunferência da fibra e do axônio em cortes transversais e convertendo áreas em diâmetros, assumindo que são circulares (STASSART et al., 2018).

Acredita-se que a razão-g de um axônio mielinizado é ajustada para atingir a máxima eficiência e otimização fisiológica. Este conceito é corroborado por observações de que, durante a recuperação de doenças desmielinizantes, os axônios centrais passam por um período inicial de hiperremielinização e aumento de diâmetros que, eventualmente, retornam à razão-g normal. (CHOMIAK; HU, 2009).

A faixa da razão-g mostrada como ideal em corpo caloso (CC) de roedores é 0.75 – 0.81 (CHOMIAK; HU, 2009). Em estudo com tecidos de nervo óptico de portadores de EM foi encontrada valores de razão-g menores na região de substância branca aparentemente normal em comparação com os indivíduos controles. Como não foi encontrada diferença no calibre do axônio, área da língua interna ou espaço periaxonal entre EM e controles, é provável que a razão-g alterada na EM seja devido às mudanças na própria mielina, como a redução da densidade de mielina devido à sua menor compactação (VAN DEN BOSCH et al., 2023). Essa menor compactação pode ser justificada pela redução de esfingolipídios e um aumento de

fosfolipídios, o que leva a um aumento da energia repulsiva na linha intraperiódica capaz de desestabilizar a mielina (WHEELER et al., 2008). Já na região cortical de pacientes com EM analisada em outro estudo, foi visto um aumento da razão-g como evidência quantitativa da remielinização (ALBERT et al., 2007). Logo, espera-se uma razão-g menor em situações de mielina descompactada e uma razão-g maior em situações de remielinização.

1.3 Células Progenitoras de Oligodendrócitos e Oligodendrócitos

A regeneração tecidual após lesão ou doença é um objetivo há muito procurado, particularmente no sistema nervoso (SN) adulto. A oligodendroglia representa um dos poucos tipos celulares que mantêm a capacidade de regeneração e reparação após danos ao SNC adulto. As OPCs foram consideradas como um quarto tipo de célula da glia (PETERS, 2004), também conhecidas como células NG2 (antígeno glial neuronal 2) positivas e, apesar de representarem a minoria da população celular total do encéfalo, são fundamentais no processo de reparo tecidual (LÓPEZ-MUGURUZA; MATUTE, 2023).

Durante o processo de desenvolvimento, as OPCs são fundamentais para a formação de OLs completamente maduros e capazes de produzir mielina. Esses progenitores foram descritos como um tipo celular com caráter ambíguo compartilhando com os OLs o tamanho e a forma do soma, mas diferindo deles pelo número e características de seus prolongamentos: muito numerosos e não muito longos. Além disso, as OPCs são caracterizadas por altos níveis de expressão de marcadores específicos, como o marcador NG2, que é o motivo pelo qual também são chamadas de células NG2 positivas (PÉREZ-CERDÁ; SÁNCHEZ-GÓMEZ; MATUTE, 2015).

Apesar de sua capacidade de se proliferar rapidamente, as OPCs representam apenas uma pequena porcentagem de todas as células presentes no cérebro, sendo menos abundantes na substância cinzenta (BEITER et al., 2022). Elas surgem a partir de células-tronco neurais durante o estágio de desenvolvimento embrionário e persistem até a idade adulta, contribuindo para a manutenção da mielinização, além de impulsionar a "mielinização adaptativa" durante a aprendizagem e a memória (SPAAS et al., 2021 para revisão).

As OPCs são capazes de explorar ativamente seu ambiente e iniciar rapidamente os processos de reparo após a desmielinização. Durante a remielinização, as OPCs migram em

direção ao local da lesão, diferenciam-se em OLs maduros e envolvem axônios sobreviventes, com o objetivo de proteger os axônios desnudos da degeneração e restaurar a condução neuronal normal (MOYON et al., 2015; FRANKLIN e FFRENCH-CONSTANT, 2017).

Dessa forma, quando ocorre perda de OLs, a diferenciação das OPCs é fundamental para gerar novas células mielinizantes. No entanto, a modulação da mielina também pode ser assumida pelos OLs sobreviventes às lesões, o que seria possível por algum aumento de potencial remielinizante (YEUNG et al., 2014; DUNCAN et al., 2018; BACMEISTER et al., 2020). Duncan e colaboradores (2018) observaram a presença de OLs gerando bainha de mielina espessa e bainha de mielina fina remielinizada, concluindo que tais células sobreviventes mantiveram um ou mais internodo original, enquanto reestendiam seus prolongamentos para remielinizar axônios desmielinizados adjacentes, sendo que nessas regiões remielinizadas a mielina se mostrava mais fina e os internodos eram mais curtos (Figura 3). Entretanto, discute-se que essa variação de mielina espessa e fina também poderia ocorrer pelo desenvolvimento assíncrono de bainhas de mielina durante a remielinização por OLs recém-gerados (DUNCAN et al., 2018). Assim, a restauração da bainha de mielina em situações de lesão ocorre pela diferenciação das OPCs em células mielinizantes, mas a remielinização por OLs maduros preexistentes é possível, servindo como outro alvo para intervenções terapêuticas.

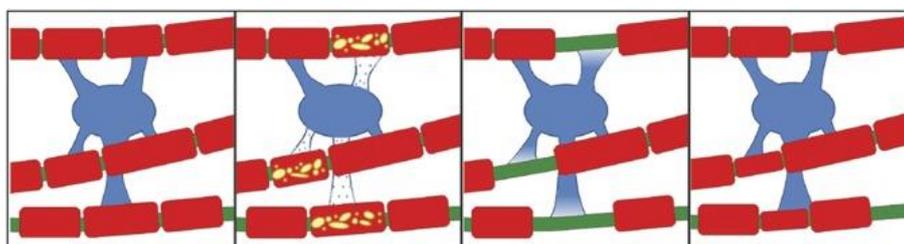


Figura 3. Representação da proposta de remielinização a partir de oligodendrócitos preexistentes à lesão. Na figura é possível observar uma perda parcial de internodos com retração de seus prolongamentos, seguido de reextensão e remielinização, gerando internodos mais finos e mais curtos (imagem retirada de DUNCAN et al., 2018).

Os OLs maduros funcionalmente ligados ao compartimento axonal mantém a mielina metabolicamente ativa (SNAIDERO, N. et al., 2017). Além disso, eles também possuem mecanismos de modulação da excitabilidade neuronal. Os OLs são portadores de canais de potássio retificador interno Kir4.1 que, juntamente com os astrócitos (AS), participam da captação dos íons K^+ em excesso no meio extracelular que ocorre, principalmente, durante o PA (Figura 4). Os OLs também são capazes de regular a liberação e o metabolismo de neurotransmissores através da expressão de glutamina sintase e da liberação de moléculas como

glutamina e fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). Além disso, os OLs e a mielina podem regular a plasticidade estrutural das sinapses através do Nogo-A. (XIN; CHAN, 2020)

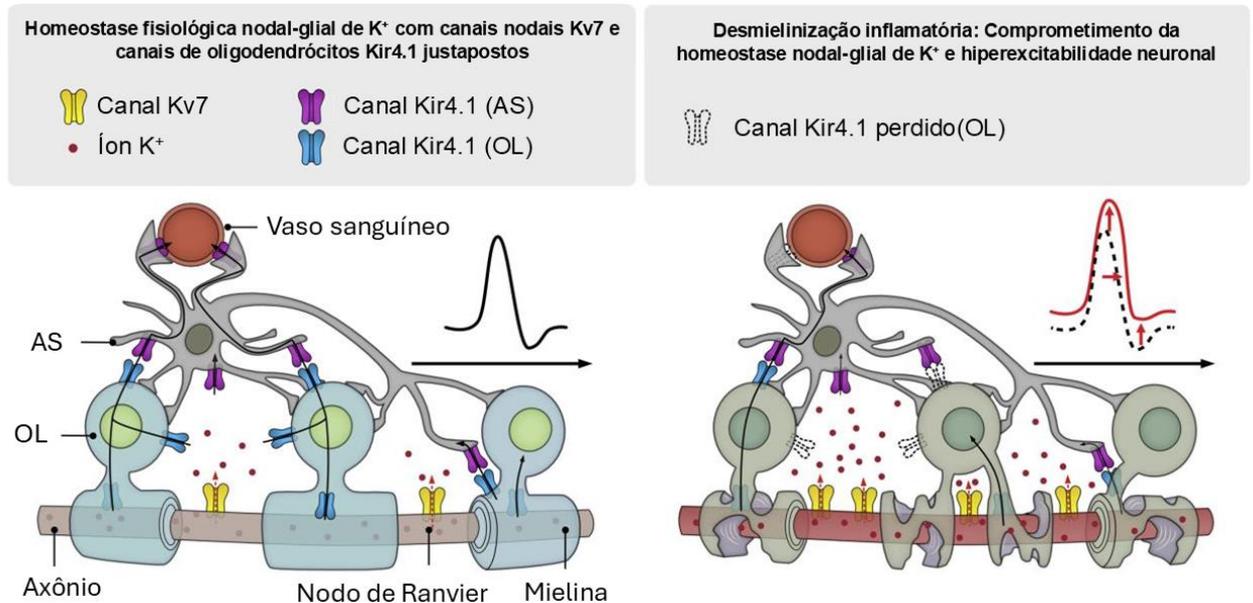


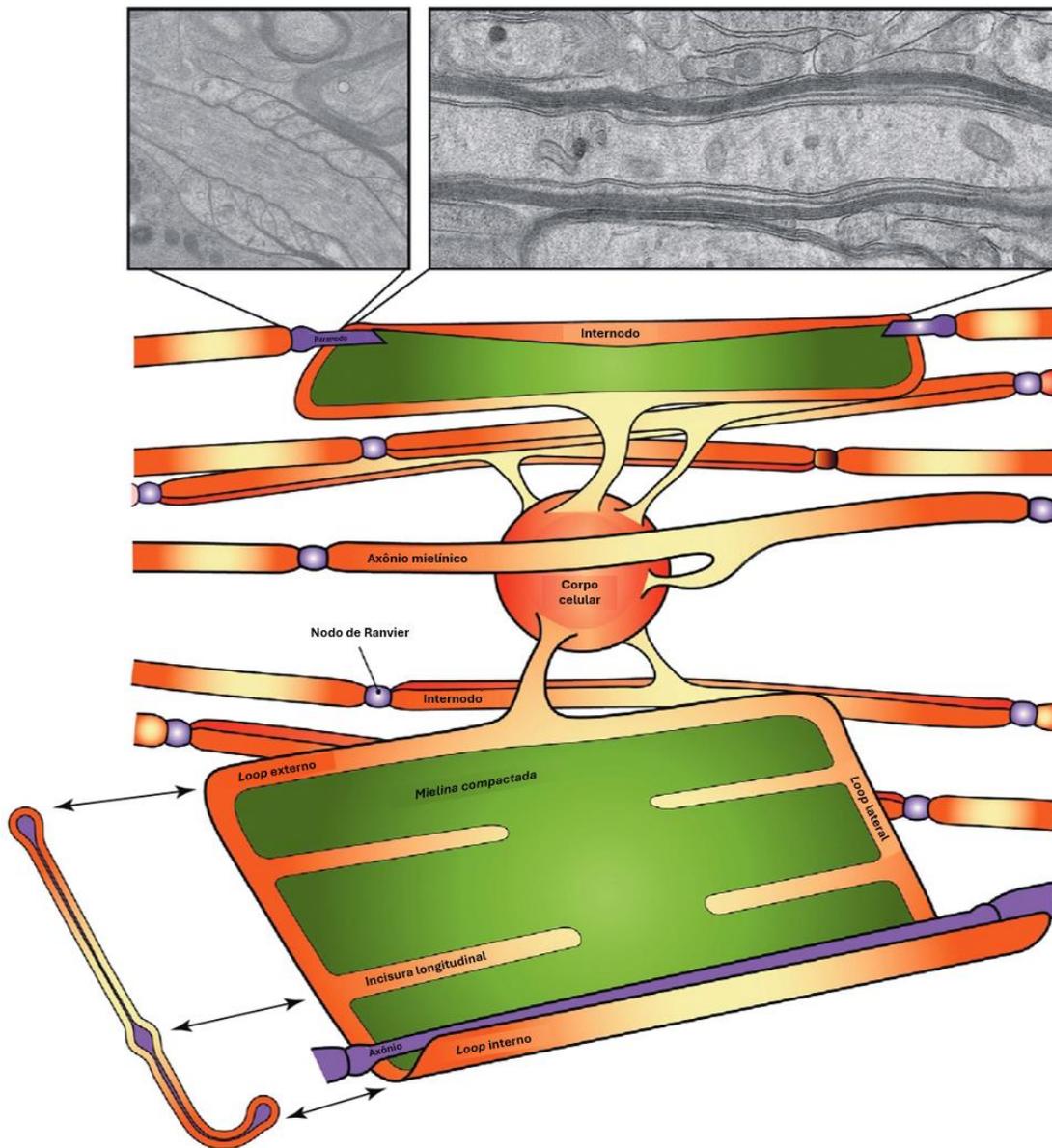
Figura 4. Ilustração esquemática mostrando o *clearance* de íons K⁺. Este é realizado pelos OLs e AS (à esquerda) e o prejuízo da homeostase do K⁺ em situações de injúria aos canais Kir4.1 presentes nessas células, levando à hiperexcitabilidade neuronal (à direita) (imagem retirada e modificada de KAPELL et al., 2023).

A regulação da atividade dos circuitos neuronais de forma independente da mielina também está relacionada às OPCs, como exemplo através da clivagem e secreção do proteoglicano de sulfato de condroitina NG2. Experimentos com camundongos com deleção de NG2, que é altamente expresso nas OPCs, mostraram que houve, no córtex somatossensorial, um comprometimento da potencialização de longo prazo dependente do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR). Além disso, observou-se redução das correntes pós-sinápticas glutamatérgicas (SAKRY et al., 2014).

É possível observar que tanto os OLs quanto as OPCs estão relacionados ao processo de mielinização, remielinização e à excitabilidade neuronal. Entender as alterações de excitabilidade provocadas por mecanismos não sinápticos, como as provocadas pelo aumento do potássio extracelular, podem contribuir com o aumento de opções de tratamento com fármacos anticonvulsivantes que não atuem por um mecanismo sináptico.

1.4 Desmielinização e anormalidades de mielina

Johnson e Ludwin (1981) mostraram pela primeira vez que a desmielinização ocorrida no modelo de dieta com CPZ vem acompanhada por uma gliopatia no SNC devido à incapacidade de manutenção dos processos metabólicos pelos OLs, ocorrendo um comprometimento das porções distais dos prolongamentos dessas células. Esse mecanismo de degeneração retrógrada já havia sido descrito nos neurônios. No caso dos OLs, a porção que inicialmente sofre alteração é a língua interna localizada entre a bainha de mielina compactada e o axônio, devido a distúrbios metabólicos causados pela longa distância do corpo celular e alta demanda energética que deixam essas regiões mais vulneráveis. Essas alterações começaram a ser vistas a partir da 3 ou 4ª semana de dieta com CPZ 0,6% e morfologicamente apareciam como alargamento da língua interna com perda de características citoplasmáticas reconhecíveis como microtúbulos, formação de corpos densos, vacúolos e acúmulo de organelas (Figura 6). Weil (2016) observou o aparecimento de separações das lamelas de mielina na 2ª semana, de vacuolização da mielina na 3ª semana e de axônios desnudos na 4ª semana de exposição à CPZ.



TRENDS in Cell Biology

Figura 5. Ilustração esquemática mostrando um oligodendrócito mielinizando vários axônios, formando as regiões internodais em situações fisiológicas. A bainha de mielina é mostrada em seu estado desenrolado, composta por porções compactadas (verde) mais centrais e não compactadas (laranja) em sua borda que formam os loops paranodais (imagem em ultraestrutura, acima do desenho esquemático, de corte longitudinal, mostrando região paranodal) (imagem retirada e modificada de AGGARWAL; YURLOVA; SIMONS, 2011).

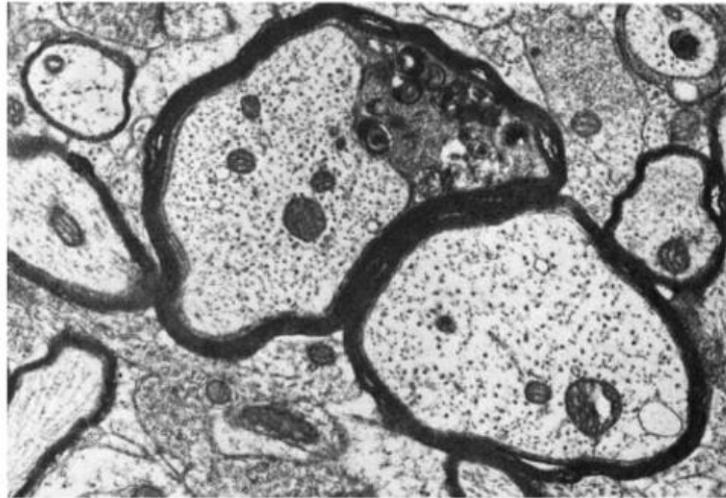


Figura 6. Alterações em língua interna. Imagem de tecido retirado da região do pedúnculo cerebelar superior de animais submetidos à dieta com CPZ, mostrando fibra mielínica com acúmulo de corpos densos, vacúolos e debris na língua interna (imagem retirada de JOHNSON; LUDWIN, 1981).

Em material proveniente de biópsias de pacientes portadores de EM também foi visualizado na ultraestrutura a presença de alargamento, degeneração e acúmulo de organelas na língua interna. Essas alterações, embora infrequentes na ME, estavam presentes na maioria das amostras de biópsia dos pacientes. (RODRIGUEZ et al., 1993)

Nas primeiras duas semanas do processo de desmielinização induzida por CPZ, a vacuolização de algumas fibras mielinizadas é observada, diminuindo em quatro semanas quando as anormalidades da língua interna são mais frequentes e extensas e as bainhas de mielina mostram sinais de desintegração. (BLAKEMORE, 1972) Esta pode ser explicada pela redução da ligação da MBP à membrana, passando para um estado de moléculas solúveis individuais, conforme ocorram alterações no ambiente lipídico ou na homeostase iônica. Uma vez que a rede de MBP é prejudicada ocorre uma diminuição na adesão das lamelas com conseqüente formação de vesículas (MARIE-THERES WEIL, 2016). Essas observações sugerem que a desmielinização por CPZ começa com vacuolização das fibras e evolui para desintegração da mielina devido à possível redução de componentes responsáveis pela compactação da mielina.

Em vários modelos de doenças desmielinizantes viu-se que o padrão de fragmentação da mielina era semelhante e envolvia, inicialmente, o alargamento do espaço adaxonal da bainha de mielina seguido pela vesiculação da língua interna que progride até que todas as camadas previamente compactadas sejam afetadas e a mielina completamente fragmentada (Figura 7)

(MARIE-THERES WEIL, 2016).

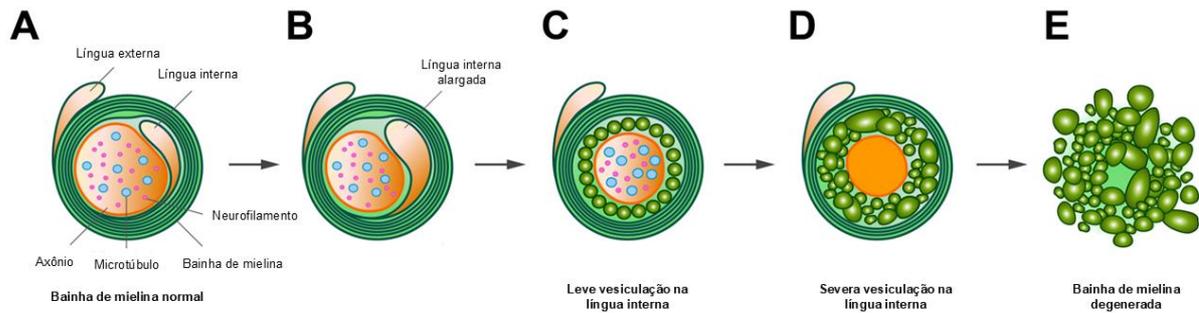


Figura 7. Ilustração esquemática mostrando a fragmentação da mielina nos estágios iniciais da desmielinização. A.) Seção transversal de um axônio mielinizado com mielina compactada (verde) e com regiões de língua interna e externa caracterizadas por citoplasma abundante (laranja). Inicialmente, a língua interna torna-se aumentada (B) e em seguida colapsa-se em pequenas vesículas no espaço adaxonal (C). A vesiculação progride ao longo do tempo (D) até que todas as lamelas de mielina se degenerem (E) (imagem retirada e modificada de (MARIE-THERES WEIL, 2016).

A retirada da bainha de mielina se dá por diferentes formas como a remoção das lamelas de mielina pela microglia, fagocitose de vacúolos de mielina, translocação total da bainha de mielina para um lado do axônio deixando-o desnudo, translocação parcial da bainha de mielina para um lado do axônio permanecendo em continuidade com um pequeno número de lamelas o envolvendo, desintegração da mielina ao redor do axônio em grandes arranjos lamelares desordenados ou pequenos arranjos vesiculares, invasão do espaço periaxonal ou envolvimento da bainha de mielina pelo citoplasma de uma célula fagocítica (BLAKEMORE, 1972; BLAKEMORE, 1973)

1.5 Potencial de ação na desmielinização

As fibras mielínicas saudáveis são essenciais para que a condução do impulso nervoso seja realizada de forma saltatória, podendo atingir velocidades superiores a 100 m/s e frequências 100 vezes mais rápidas do que a condução de impulsos em axônios não mielinizados (WADDELL; LAWSON, 1990). A presença da mielina em uma espessura adequada é fundamental para permitir o maior afastamento e, conseqüentemente, a redução da interação das cargas intra e extra-axonais, garantindo assim o aumento da velocidade do fluxo da corrente longitudinal (FRANSSSEN, 2019). No entanto, a mielina pode ser comprometida em várias doenças neurológicas, como a EM, levando a disfunções sensoriais e motoras.

As mudanças na voltagem da membrana, mediadas por fluxos iônicos através de canais regulados por voltagem e transmissores, são fundamentais para a atividade neural, determinando a direção e a força motriz dos íons e, conseqüentemente, as propriedades da transmissão sináptica e propagação do sinal. Gradientes de concentração de íons, mantidos por diversos mecanismos, inclusive proteínas transportadoras especializadas, podem ser alterados durante atividades neurais elevadas, influenciando o fluxo iônico em potenciais sinápticos e potenciais de ação. Esses fenômenos são observados em processos fisiológicos e patológicos, como crises convulsivas, que resultam em significativas mudanças nas concentrações iônicas intra e extracelulares (RAIMONDO et al., 2015).

A sinalização eletroquímica no SN é mediada pelo movimento de íons conforme seus gradientes eletroquímicos transmembranares, gerando correntes iônicas. Os gradientes iônicos são estabelecidos por mecanismos ativos e passivos, sendo que a maior parte do metabolismo cerebral é dedicada a mecanismos ativos, especialmente à bomba Na^+/K^+ ATPase, que utiliza ATP para manter gradientes opostos e eletrogênicos de Na^+ e K^+ . Esses gradientes são utilizados por diversos canais para modular o potencial elétrico neuronal, com canais de vazamento de K^+ contribuindo majoritariamente para o potencial de repouso e canais de Na^+ e K^+ regulados por voltagem sustentando potenciais de ação (RAIMONDO et al., 2015).

Em situação fisiológica, o PA ocorre quando a despolarização da membrana provoca a abertura rápida dos canais de Na^+ dependentes de voltagem (Nav), resultando em um aumento na condutância desse íon com influxo de Na^+ para o meio intracelular, gerando uma corrente iônica interna de sódio e uma corrente capacitiva externa em uma parte adjacente do axolema ou mais distante, no nodo que precisa ser ativado (FRANSSEN, 2019). Esse fluxo de corrente de Na^+ gera uma despolarização adicional, abrindo mais canais Nav e intensificando ainda mais o influxo de corrente na célula, caracterizando a fase ascendente do PA. Gradualmente, os canais Nav se inativam, diminuindo a condutância da membrana a esse íon, enquanto os canais de K^+ dependentes de voltagem (Kv) se abrem com retardo, aumentando a condutância da membrana ao K^+ e promovendo a repolarização da membrana com o efluxo desse íon do meio intracelular (KANDEL, 2013). A saída de íons K^+ ocorre, pois, a força motriz química externa – gerada pela maior concentração de potássio no meio intracelular – excede a força motriz elétrica interna – gerada pela atração eletrostática para o meio intracelular. Assim, a corrente iônica de K^+ para fora da célula gera uma corrente capacitiva interna, resultando na acumulação

de cargas positivas no exterior do axolema (FRANSSEN, 2019).

O PA é seguido por um pós-potencial hiperpolarizante, uma mudança temporária do potencial de membrana para valores mais negativos que o potencial de repouso. Essas alterações breves ocorrem porque os canais de K^+ que se abrem durante a repolarização do PA permanecem abertos por um período após o retorno do potencial de membrana ao seu valor de repouso. Demora alguns milissegundos até que todos os canais K_v se fechem, deixando o potencial de membrana ligeiramente mais negativo que o valor normal do potencial de repouso. Esse é o período refratário absoluto, um curto intervalo que segue o PA, durante o qual é impossível gerar outro PA. À medida que os canais K_v começam a se fechar e alguns canais Nav se recuperam do estado de inativação, a membrana entra no período refratário relativo, quando é possível gerar um PA, mas apenas se for aplicado um estímulo mais forte do que o necessário para atingir o limiar em condições normais (KANDEL, 2013).

Para que o PA seja gerado e conduzido de forma eficiente é fundamental uma organização molecular dos segmentos iniciais de axônio e nodos de Ranvier em fibras mielinizadas. Essa organização consiste em uma abundância de canais Nav na região nodal, o que é necessário para a ativação rápida desses canais e para geração de corrente elétrica suficiente para despolarizar o próximo nodo de Ranvier ao longo do axônio durante a geração e propagação do PA, respectivamente. Quaisquer canais que estejam localizados de forma errada em regiões internodais, onde estão cobertos por múltiplas camadas de mielina, experimentarão uma mudança de voltagem menor e se ativarão menos e mais lentamente. Além disso, uma diminuição do número de canais de sódio funcionais pode causar falha na propagação (ARANCIBIA-CARCAMO e ATTWELL, 2014).

Sabe-se que os canais Nav são críticos para a bioeletrogênese e foram identificadas várias isoformas desses canais. Os canais de sódio dependentes de voltagem do tipo 1.2 ($Nav1.2$) encontra-se em neurônios do SNC pré-mielinizados e nos nodos de Ranvier imaturos, já a expressão de $Nav1.6$ ocorre nos nodos maduros. A presença de cada isoforma se relaciona com a função de determinada fibra nervosa. Por exemplo, os $Nav1.6$ estão associados com correntes elétricas persistentes maiores que poderiam iniciar um fluxo de íons danoso, contribuindo para a degeneração axonal em axônios desmielinizados; além de estarem relacionados a disparos rápidos e em rajadas e terem um início relativamente rápido de inativação. Já os canais $Nav1.2$ estão associados a correntes persistentes menores e são propensos a gerar frequências de

disparos mais baixos (RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005).

Foi observada uma dispersão difusa dos canais Nav ao longo do axônio desnudado e desmielinizado em modelos experimentais de desmielinização e em lesões de EM (COMAN et al., 2006), além da mudança na expressão dos canais Nav de uma isoforma madura (Nav1.6) para uma isoforma imatura (Nav1.2), sugerindo que a desmielinização pode promover alterações na expressão de determinados canais iônicos, assim como nas suas distribuições ao longo da região nodal (CRANER, 2004). Essa dispersão dos componentes dos nodos de Ranvier ao longo dos axônios juntamente com a inibição da transição de canais Nav1.2 para Nav1.6 se relacionam com mutações genéticas que geram a deficiência de CASPR1 (ZOU et al., 2017), mostrando que a presença de CASPR é fundamental para a organização e expressão dos canais de sódio.

A maioria dos canais Kv do tipo 1 está localizada na região justaparanodal (RASBAND et al., 1999), embora os canais Kv3.1b e os canais KCNQ de ativação lenta (também conhecidos como canais Kv7) estejam presentes no próprio nodo de Ranvier (ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014). Além disso, canais de vazamento de potássio como K2P de subtipos TREK-1 e TRAAK também estão localizados na região nodal (KANDA et al., 2019). Durante a desmielinização de camundongos tratados com CPZ, viu-se que a maioria dos justaparanodos estavam alongados devido à disseminação e aparência ectópica de canais Kv1.1 e Kv1.2 nos internodos, sendo os Kv1.1 mais numerosos (BAGCHI et al., 2014).

A cinética de funcionamento de todos esses canais juntamente com a organização da mielina é fundamental para a geração de voltagem e das correntes elétricas. As junções adesivas entre os prolongamentos de OLs e o axônio são fundamentais para reduzir o fluxo de corrente sob a mielina, diminuindo a capacitância efetiva da membrana axonal (ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014). Assim, a desmielinização paranodal resulta no vazamento e na dispersão da corrente de condução sobre a área que compreende o antigo nodo de Ranvier e o axolema paranodal desnudado. Como essa área terá uma capacidade elétrica maior do que o nodo normal, haverá um aumento no tempo ou bloqueio da condução internodal. Quando a desmielinização atinge o justaparanodo, há exposição dos canais Kv1 ou dispersão destes para os antigos nodos. Esses canais expostos podem ser ativados pela corrente de condução, o que poderá encurtar ou bloquear o PA. Portanto, o tempo prolongado do período refratário em axônios desmielinizados se deve ao aumento da capacitância elétrica da membrana, à fuga da

corrente de condução e à redistribuição dos canais nos nodos e áreas adjacentes, resultando em um tempo maior necessário para despolarizar. (FRANSSEN, 2019).

1.5.1 Potássio extracelular e sua relação com a hiperexcitabilidade cerebral

Os neurônios ficam imersos em um fluido extracelular com alta concentração de íons Na^+ e baixa concentração de íons K^+ . Dentro das células neuronais em repouso ocorre o inverso, ou seja, há alta concentração de íons K^+ e baixa concentração de íons Na^+ . Isso permite a formação de gradientes eletro-químicos através da membrana celular que são essenciais para formação do PA que envolve a entrada de Na^+ e a saída de K^+ discutido anteriormente (KOFUJI; NEWMAN, 2004)

Durante as convulsões, a concentração extracelular de íons K^+ aumenta significativamente em relação a estados fisiológicos, e retorna ao nível normal após a cessação da crise. A elevação de íons K^+ no meio extracelular em níveis fisiologicamente mais altos (6 – 9 mM) gera efeitos excitantes, mas viu-se também que concentrações acima de 9 mM foram capazes de inibir as atividades ictais em tecidos epilépticos (WANG et al., 2016). O aumento de fluxos iônicos extracelulares através de um axônio desmielinizado pode influenciar a excitabilidade dos axônios vizinhos por interações efápticas que acoplam eletricamente as fibras nervosas como resultado de campos elétricos locais (DE CURTIS; GARBELLI; UVA, 2021). Isso foi mostrado com a indução de potenciais de ação ectópicos por meio da aplicação de solução com alta concentração de K^+ na proximidade de internodos desmielinizados por CPZ (HAMADA; KOLE, 2015). Logo, o excesso de íons K^+ liberado durante a despolarização celular excessiva pode ser capaz de gerar excitabilidade na rede celular.

Existem duas formas de fenômenos comunicacionais intercelular: transmissão por “fiação” e por “volume” (figura 8). A transmissão por “fiação” está associada à comunicação celular por meio de uma estrutura de conexão bem definida, como ocorre na transmissão sináptica e nas comunicações por junções comunicantes. Já a comunicação por “volume” se dá pela transmissão do sinal por meio da difusão pelo espaço extracelular (AGNATI et al., 1995; NICHOLSON, 2000).

A comunicação por fiação possui sua eficácia modulada pelas mudanças na taxa de liberação ou degradação do sinal e estas podem fazer com que a comunicação por volume

apareça ou desapareça completamente. Ou seja, na transmissão por volume, uma célula-alvo pode ou não ser alcançada pelo sinal. As características do percurso tomado pela transmissão por volume podem ser facilmente modificadas por mudanças químicas no meio extracelular ou por mudanças na geometria das estruturas celulares. (AGNATI et al., 1995)

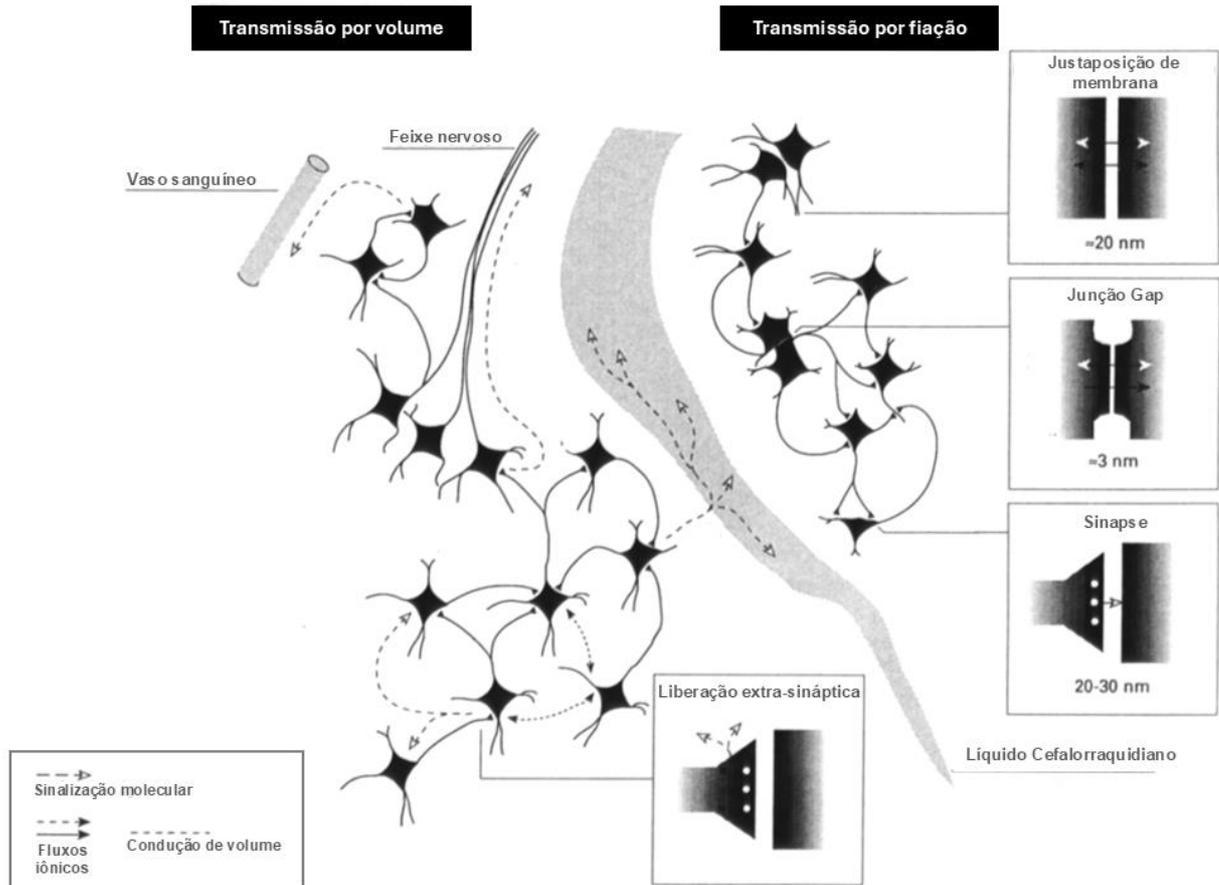


Figura 8. Ilustração esquemática mostrando os principais tipos de comunicação intercelular no SNC: transmissão por fiação (à direita) e por volume (à esquerda) (imagem retirada de AGNATI et al., 1995).

No espaço extracelular do encéfalo, as membranas celulares representam obstáculos fazendo com que as moléculas/íons em difusão colidam com estes em seus movimentos aleatórios, o que afeta a distribuição das suas concentrações. O nível de obstáculos pode ser mensurado por meio da variável tortuosidade, e viu-se que esta pode variar em determinadas condições, como em algumas doenças neurológicas. Observou-se em modelo animal de EM por meio do EAE uma diminuição da tortuosidade, o que se relaciona a alterações na distribuição iônica no meio extracelular desses animais (NICHOLSON, 2000).

Com a degradação da bainha de mielina na região do paranodo e justaparanodo, ocorre

perda de NF155 e sobreposição dos canais Nav com a CASPR1 (proteína paranodal), além disso, os canais Kv1 que antes eram cobertos pela mielina na região do justaparanodo, são capazes de gerar um efluxo de potássio para o meio extracelular que antes era majoritariamente capturado pelos prolongamentos dos OLs envolvendo o axônio (ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014; XIA et al., 2020; DE CURTIS; GARBELLI; UVA, 2021). Assim, ocorre o vazamento de correntes iônicas e capacitivas na área de descontinuidade de mielina, podendo encurtar ou bloquear o PA (FRANSSEN, 2019). Isso foi confirmado ao observar uma duração mais prolongada do impulso nervoso com o bloqueio dos canais de potássio com a Fampridina ou 4-aminopiridina, além da predisposição ao surgimento de convulsões como efeito adverso dessa substância quando usada em algumas situações de tratamento para EM (RASBAND et al., 1999; JUDGE; BEVER, 2006). Entretanto, o aumento na concentração de potássio pode se difundir mais facilmente nos tecidos desmielinizados, devido à menor tortuosidade (NICHOLSON, 2000). Isso pode gerar uma comunicação celular via transmissão por volume e induzir a despolarização de fibras nervosas adjacentes.

Para manter os íons K^+ em concentração fisiológica e equilibrar a excitabilidade do tecido cerebral, diferentes mecanismos são acionados para tamponar os íons K^+ liberados no espaço extracelular durante a atividade neuronal. A remoção de íons K^+ extracelulares é realizada principalmente pela bomba Na^+/K^+ -ATPase em axônios e células gliais, e pelos canais Kir4.1 presentes em OLs e ASs. Esses canais são expressos na língua interna de fibras mielínicas e em locais de conexão entre OLs e ASs. Logo, a perda de OLs leva à diminuição do tamponamento de íons K^+ e no seu acúmulo extracelular (XIA et al., 2020; DE CURTIS; GARBELLI; UVA, 2021). Além disso, a exclusão dos canais Kir4.1 na glia de camundongos está associada a um tamponamento lento de K^+ e aumento da suscetibilidade a crises convulsivas (CHEVER et al., 2010).

Entender como ocorre a modulação neuronal não sináptica e os mecanismos envolvidos no *clearance* do potássio extracelular ajudará na busca por novos fármacos para tratamento de doenças desmielinizantes associadas à ocorrência de convulsões refratárias aos medicamentos anticonvulsivantes disponíveis.

1.6 Doenças desmielinizantes e distúrbios de excitabilidade

Existem diferentes mecanismos patogênicos de dano à mielina e aos OLs: (BRADL e

LASSMANN, 2010)

a) Destruição simultânea de OLs e mielina: Quando a lesão inicial atinge tanto a mielina quanto os OLs simultaneamente, são formadas placas de desmielinização primárias claramente delimitadas (STORCH et al., 1998). As bainhas de mielina são completamente perdidas, alguns OLs sofrem necrose durante o processo de lesão aguda e outros, com preservação parcial de seus corpos celulares, sofrem apoptose, sendo removidos lentamente do tecido lesionado (WOLSWIJK, 2000).

b) Lesão primária de OLs: Caracterizada pela falta de impacto direto à mielina e por lesão inicial decorrente de um distúrbio metabólico nos OLs, levando a morte dessas células tanto por apoptose quanto por necrose. Nesse cenário, a desmielinização frequentemente ocorre de maneira incompleta (MURAYAMA e SAITO, 2007; BRADL e LASSMANN, 2010). Danos tóxicos aos OLs, como os provocados pela CPZ, também resultam em padrões semelhantes de desmielinização (TORKILDSEN et al., 2008).

c) Desmielinização e dano aos OLs induzidos por lesão mitocondrial e/ou deficiência energética: A deficiência energética na substância branca afeta gravemente os OLs, levando à chamada "*distal/dying back oligodendroglíopathy*", caracterizada por gerar áreas de desmielinização incompleta com perda seletiva de proteínas. Nas lesões iniciais, as partes mais gravemente danificadas das células são os prolongamentos mais distais (periaxoniais) dos OLs (ITOYAMA et al., 1980; ABOUL-ENEIN et al., 2003). As lesões também mostram condensação nuclear nos OLs e destruição preferencial de axônios menores, com preservação ao redor de vasos sanguíneos mais calibrosos. Essas alterações são características de lesões isquêmicas iniciais na substância branca, mas também podem ocorrer em casos de doenças inflamatórias graves, como em algumas formas de EM ou infecções virais (ABOUL-ENEIN et al., 2003). A progressão da deficiência energética está associada a danos mitocondriais profundos, que podem ser induzidos por distúrbios da cadeia respiratória mitocondrial através de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MAHAD et al., 2008).

O resultado de todas as lesões descritas acima é a formação de áreas focais ou difusas de desmielinização na substância branca (BRADL; LASSMANN, 2010).

Os pacientes com EM possuem uma produção reduzida de ATP, potencialmente

resultante da diminuição das atividades dos complexos da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (BARCELOS; TROXELL; GRAVES, 2019). Além da alteração na bioenergética, a disfunção mitocondrial está fortemente associada ao metabolismo do oxigênio e à geração de ROS no SNC (ADIELE; ADIELE, 2019). Como as ROS e seus produtos reativos atacam todas as classes de biomoléculas, incluindo lipídios, o SNC, que compreende membranas com níveis elevados de ácidos graxos, tem alta vulnerabilidade aos danos causados pelos efeitos adversos destas espécies reativas (BUTLER; BRADFORD; RODGERS, 2022). Um foco especial é dado para as OPCs devido aos seus mecanismos de defesa antioxidante limitados. Como resultado, as OPCs são incapazes de sofrer maturação em OLs formadores de mielina, o que proporciona prejuízos na produção e manutenção da mielina no contexto da EM (SPAAS et al., 2021b). Dessa forma, a disfunção mitocondrial em pacientes com EM pode levar danos celulares que culminam em prejuízos na transmissão de impulsos elétricos e no transporte axonal e iônico (LÓPEZ-MUGURUZA; MATUTE, 2023).

1.6.1 Esclerose Múltipla e hiperexcitabilidade cerebral

A EM é uma doença crônica neurodegenerativa e inflamatória que acomete o SNC, caracterizada por lesões desmielinizantes que levam a uma grande variedade de sintomas experimentada pelos pacientes, como envolvimento dos sistemas motores, sensoriais e autonômicos de acordo com o sítio acometido pela doença, podendo gerar desequilíbrios da excitabilidade e convulsões (COMPSTON et al., 2008; DI FILIPPO et al., 2015; YONG et al., 2017).

A doença acomete principalmente adultos jovens, entre 20 e 40 anos, em idade produtiva da vida, tendo um grande impacto pessoal e social. As opções terapêuticas disponíveis atualmente são capazes de reduzir ou retardar a incapacidade, oferecendo maior conforto aos portadores, entretanto, a cura ainda não foi estabelecida, assim como suas causas ainda não são completamente compreendidas (WALTON et al., 2020).

Allen e colaboradores (2013) mostraram que a EM e a epilepsia ocorrem juntas mais frequentemente do que por acaso. Uma justificativa é que uma lesão desmielinizante pode atuar como um foco epileptogênico e é importante o conhecimento do risco de convulsões nesses pacientes para melhor definição do manejo terapêutico. Além disso, essa associação entre EM e epilepsia estimula o desenvolvimento de hipóteses sobre os mecanismos subjacentes às duas

condições (ALLEN; SEMINOG; GOLDACRE, 2013).

A maioria dos pacientes com EM inicia a doença com uma fase remitente-recorrente (EM remitente-recorrente) que após alguns anos evolui para uma fase progressiva secundária (EM progressiva secundária). Entretanto, em alguns pacientes não há uma fase remitente-recorrente e a doença possui uma forma progressiva desde o início dos sintomas (EM progressiva primária). Seu tratamento medicamentoso inclui anti-inflamatórios, imunomoduladores ou imunossupressores. Entretanto, como as características patológicas das diferentes fases da doença diferem, o tratamento que é parcialmente efetivo em uma forma clínica da EM pode não se mostrar eficiente em outras (LASSMANN et al., 2007; COMPSTON et al., 2008; LASSMANN et al., 2013).

A EM é definida por lesões desmielinizantes inflamatórias no SNC (NOSEWORTHY et al., 2000; LASSMANN et al., 2007), caracterizadas pela formação de placas de desmielinização na substância branca e cinzenta. O processo de formação dessas lesões é caracterizado pela morte de OLs e degradação da bainha de mielina na fase aguda (EM remitente-recorrente), enquanto os axônios e os corpos celulares neuronais são preservados em parte nesse momento. Entretanto, com a progressão da doença e das lesões, ocorre uma perda substancial de axônios (LASSMANN et al., 2013). Essa injúria à bainha de mielina resulta em axônios mal mielinizados ou desnudos que deixam de ser capazes de transmitir PAs eficientemente. Esse prejuízo ou bloqueio na condução de potenciais de ação resulta nos diversos sintomas neurológicos da doença. Esses segmentos axonais expostos podem ser suscetíveis a outras lesões, coordenadas por citocinas pró-inflamatórias, proteínas do sistema complemento e proteases, resultando em lesão axonal irreversível (NOSEWORTHY et al., 2000).

Há vários mecanismos possíveis de reparo da mielina ou compensação para permitir a propagação dos PAs, como a resolução da resposta inflamatória seguida de aumento de canais de sódio dependentes de voltagem nos nodos de Ranvier para cobrir os segmentos axonais desnudos e restaurar a condução, bem como por remielinização resultante da proliferação, migração e diferenciação de OPCs (NOSEWORTHY et al., 2000). Apesar dessa tentativa de reparo, a bainha de mielina característica da remielinização é mais fina e com internodos mais espaçados entre si. Entretanto, a perda axonal nessas áreas é mais baixa do que nas áreas desnudas, mostrando que a remielinização pode proteger os axônios da degeneração

(LASSMANN et al., 2007; LASSMANN et al., 2013).

Nas áreas de lesão observa-se inflamação difusa, ativação da microglia, cicatrizes astrocíticas e lesão axonal difusa (LASSMANN et al., 2007). A microglia se relaciona à secreção de várias citocinas pró-inflamatórias, realização de fagocitose de fragmentos de mielina e recrutamento de leucócitos para o sítio de injúria no SNC. Sabe-se que a ativação da microglia / macrófagos está associada à desmielinização e à neurodegeneração, porém ainda não está claro se sua ativação é o gatilho primário para a formação da lesão ou se é ativada pelos linfócitos autorreativos contra proteínas da mielina provenientes de órgãos linfoides periféricos (ELAINE O'LOUGHLIN et al., 2018). Independentemente do mecanismo de geração da lesão, ela se caracteriza por processo inflamatório que danifica a bainha de mielina, levando à falha de condução do impulso nervoso, com eventual morte de OLs e neurônios.

A compreensão de mecanismos que possam proteger contra a desmielinização e morte das células neurais, bem como estimular a remielinização e normalização da atividade elétrica dos axônios pode permitir a identificação de novos alvos terapêuticos e tratamentos para diferentes aspectos de doenças desmielinizantes do SNC como a EM.

1.6.2 Cuprizona como modelo de desmielinização no SNC

Existem dois modelos animais muito utilizados para estudar a EM: o modelo da Encefalomielite experimental autoimune (EAE) e modelo de dieta com CPZ (KIPP et al., 2016).

No modelo EAE, os animais são imunizados com um antígeno relacionado à mielina do SNC administrado com adjuvante e toxina pertussis, que permeabiliza a barreira hematoencefálica (BBB). Após a imunização, os antígenos do SNC são fagocitados por células apresentadoras de antígenos que são dirigidas para nódulos linfáticos locais ou baço e interagem com linfócitos T autorreativos. Essas células T deixam os órgãos linfoides periféricos e invadem o SNC via BBB danificada, induzindo inflamação na medula espinhal, cerebelo, nervo óptico e encéfalo. Esse modelo permite a investigação da fase remitente-recorrente da EM uma vez que os animais imunizados enfrentam ondas de desmielinização / remielinização (KIPP et al., 2016).

No modelo de intoxicação por CPZ, diferentemente do EAE, as células T e a quebra da

BBB não são necessárias para a desmielinização. A CPZ é um quelante de cobre e é conhecida por possuir propriedades neurotóxicas, servindo como uma ferramenta farmacológica valiosa para induzir a desmielinização em animais de laboratório. Sua ação consiste em inibir enzimas da cadeia respiratória mitocondrial de OLs (ver MESSORI et al., 2007 para revisão). Isso gera estresse oxidativo, levando essas células à apoptose com concomitante ativação da microglia e de ASs. Assim, a desmielinização induzida por CPZ é caracterizada por degeneração de OLs e não por um ataque direto à mielina. O primeiro sinal de apoptose de OLs pode ser visto dois dias após se iniciar a dieta com CPZ, paralelamente a uma maciça redução de RNAm específicos de OLs. A CPZ atinge específica e diretamente os OLs do SNC, sem afetar as células de Schwann do SNP (KIPP et al., 2009; WANG et al., 2013; KIPP et al., 2016).

A CPZ causa desmielinização de forma heterogênea no SN, além de ocorrer com curso temporal distinto (GUDI et al., 2009). A desmielinização do CC está completa após 4-5 semanas de intoxicação com CPZ, paralelamente à massiva microgliose, astrocitose e dano axonal. Já a desmielinização do córtex se mostrou atrasada em comparação à do corpo caloso, e só se mostrou significativa após a 6ª semana de dieta com CPZ (GUDI et al., 2009). A remielinização ocorre caso a dieta com CPZ seja interrompida e os animais voltem a ingerir a dieta original. Devido a isso, o modelo da CPZ pode ser utilizado para estudar os mecanismos que ocorrem durante a remielinização quando a dieta é interrompida, ou da forma progressiva primária ou secundárias da doença, quando a dieta com CPZ não é interrompida (WANG et al., 2013; KIPP et al., 2016).

Estudos prévios da nossa equipe mostraram que, após cinco semanas de intoxicação por CPZ, o CC é quase completamente desmielinizado, assim como uma pequena desmielinização do trato óptico e manutenção da mielina do nervo óptico (ARAÚJO et al., 2017). A desmielinização também ocorre no núcleo geniculado lateral na substância cinzenta, com concomitante ativação microglial e astrocitária e elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, alterando as propriedades excitáveis do circuito retinogeniculado, com alteração do equilíbrio excitação / inibição (ARAÚJO et al., 2017). Isso mostra um ambiente inflamatório gerado pelo modelo de dieta com CPZ que se relaciona com alterações na excitabilidade nervosa.

Dessa forma, o conhecimento dos processos fisiopatológicos do modelo da dieta com CPZ nos permitirá investigar se as formas progressivas de EM interferem na excitabilidade cerebral, através dos danos causados na bainha de mielina.

1.7 Tratamento na Esclerose Múltipla

O tratamento da EM pode ser dividido em tratamentos modificadores de doença (DMTs) que são usados para reduzir a atividade da doença inflamatória e suas consequências clínicas a longo prazo, e fármacos sintomáticos, como corticoides, usados para melhora a curto prazo dos sintomas da EM que ocorrem nos momentos de surtos. Vários DMTs estão disponíveis para o tratamento da EM como o acetato de glatirâmer, teriflunomida, fumarato de dimetila, natalizumabe, alentuzumabe, azatioprina e fingolimode (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

O crescente número de DMTs aprovados melhora a possibilidade de adaptar a terapia individualmente ao paciente em relação à eficácia, aspectos de segurança e preferências. (FILIPPI et al., 2018). Apesar das opções existentes no mercado farmacêutico, há ainda situações de falhas terapêuticas, revelando a necessidade da continuidade de buscas de novos alvos farmacológicos, bem como o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos dos fármacos atualmente disponíveis.

Sabe-se que a ocorrência de convulsões em pessoas com EM têm sido relatadas desde a mais antiga definição de EM. Até 2% de todos os casos desenvolvem epilepsia dentro de 10 anos após o diagnóstico da doença. A epilepsia é uma condição neurológica comum que apresenta significativa comorbidade psiquiátrica e sistêmica, e evidências recentes indicam uma frequente coexistência de distúrbios autoimunes sistêmicos com essa doença. (PITSCH et al., 2018; AMANAT et al., 2019)

No manejo terapêutico da epilepsia presente em alguns pacientes portadores de EM, há muitos fármacos antiepilépticos, mas ainda há a necessidade de outros que sejam mais eficazes e seguros. A esfingosina 1-fosfato (S1P) e seus receptores podem representar um novo alvo adequado devido ao seu envolvimento na neuroinflamação, um processo bem conhecido subjacente às convulsões e à epileptogênese. (LEO et al, 2016). O Fingolimode é um análogo estrutural da esfingosina-1-fosfato (S1P) (BRINKMANN; CYSTER; HLA, 2004) e pouco se sabe sobre os seus mecanismos de ação quanto à redução da excitabilidade cerebral, e não há estudos na literatura sobre esse medicamento e sua associação com a excitabilidade em modelos de desmielinização cerebral, em especial o modelo da CPZ.

O fingolimode (FTY720) é uma molécula derivada da miriocina, planta medicinal chinesa, que possui propriedades imunossupressoras, mas é tóxica, necessitando de modificações estruturais que levaram à síntese do fingolimode, que tem melhor perfil de segurança (CUSACK; STOFFEL, 2010). Ele foi o primeiro medicamento modificador de doença com administração por via oral aprovado para o tratamento da EM (LEO et al., 2017). Após a sua administração ele é fosforilado pela esfingosina quinase tipo 2 transformando-se em fosfato de fingolimode (fingolimod-P), que é o metabólito lipofílico ativo que atua como agonista no receptor S1P. Isto gera a dessensibilização e internalização do receptor S1P, indicando que o fingolimode tem um efeito antagonista funcional desse receptor (BORDET et al., 2020). Dessa forma, o fingolimode é um modulador não seletivo do receptor de S1P que regula o tráfego de linfócitos que expressam esses receptores, retendo-os dentro dos órgãos linfoides secundários.

Os receptores S1P também são expressos em células gliais e o fingolimode também pode ter uma função de neuroproteção e remielinização independentemente de sua função em linfócitos periféricos. Dessa forma, esse fármaco previne que células T saiam de órgãos linfoides e atravessem a BBB, mas também, devido ao seu caráter lipofílico, é capaz de atravessar a BBB e atingir o parênquima do SNC, podendo controlar vários tipos celulares cerebrais intrínsecos que possuem receptores S1P, como OLs, neurônios e ASs e, assim, regular a morfologia, migração, crescimento, diferenciação, sobrevivência e apoptose celular (KIPP et al., 2012; ALME et al., 2015).

Os resultados referentes ao tratamento com fingolimode no modelo da CPZ se mostraram conflitantes. Este fármaco não se mostrou capaz de promover remielinização no corpo caloso ou no córtex cerebelar de camundongos após desmielinização experimentalmente induzida (ALME et al., 2015), enquanto foi evidenciado um efeito de proteção contra desmielinização, com aumento de proliferação de OPCs no corpo caloso. Adicionalmente, foi observado que o fingolimode diminuiu o número de axônios agudamente danificados (KIM et al., 2011; HU et al., 2011). Entender esses efeitos auxiliaria na elucidação dos mecanismos pelos quais o fingolimode reduz a desmielinização e previne a progressão das incapacidades associadas à EM, além de identificar os processos fisiopatológicos que o fármaco pode modular (SLOWIK et al., 2015).

Por outro lado, estudos recentes concluíram que o GPR17, um receptor acoplado à

proteína G tem um importante papel regulador no desenvolvimento e maturação dos OLs (NYAMOYA et al., 2018). O GPR17 pode ser ativado por mediadores inflamatórios como os leucotrienos cisteínicos LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (FUMAGALLI; LECCA; ABBRACCHIO, 2016). Os leucotrienos (LTs) estão relacionados com a asma, sendo que os LTs contendo cisteína (cisteinil-LTs, ou seja, LTC₄, LTD₄ e LTE₄) são broncoconstritores muito potentes. Portanto, os antagonistas dos receptores de cisteinil-LT (LTRAs), como montelucaste e pranlucaste, são utilizados no tratamento de pacientes portadores de asma (NICOSIA, 1999). Foi visto que a inibição farmacológica de GPR17 com pranlucaste promoveu remielinização (OU et al., 2016) e que camundongos transgênicos com hiperexpressão de GPR17 em OLs falharam no processo de mielinização, com inibição da diferenciação e maturação dos OLs (NYAMOYA et al., 2018).

A hiperativação de GPR17 inibe a sobrevivência dos OLs ao reduzir o nível de cAMP intracelular e ao induzir a expressão do gene pró-apoptótico Xaf1. Além disso, a superativação de GPR17 inibe a via de sinalização da proteína quinase A e a expressão do fator de transcrição c-Fos. Já a antagonização do GPR17 é capaz de aumentar a sobrevivência de OLs e promover a diferenciação de OLs imaturos, o que pode significar um importante avanço para pacientes com doenças neurodegenerativas (FUMAGALLI et al., 2017). Além desses efeitos na mielinização, os LTRAs podem ter um efeito na redução da incidência e severidade de crises convulsivas (ERBAS, 2015; FLECK et al., 2016). Estudos experimentais e clínicos têm mostrado que as convulsões induzem inflamação cerebral e as convulsões recorrentes sustentam a inflamação crônica (TESFAYE et al., 2021). Dessa forma, intervir no processo inflamatório, com fármacos como pranlucaste, pode ser uma estratégia de tratamento da hiperexcitabilidade cerebral, podendo servir como terapia adjuvante para pacientes com epilepsia intratável, o que pode ser bastante benéfico visto o menor efeito colateral em relação aos fármacos antiepilépticos frequentemente utilizados (TAKAHASHI et al., 2013).

O fingolimode é um medicamento já estabelecido e amplamente utilizado no tratamento da EM, por outro lado, o pranlucaste ainda não faz parte do arsenal terapêutico dessa doença. Entretanto, diante dos seus efeitos pelo antagonismo do GPR17 relatados acima, o pranlucaste revela um grande potencial terapêutico que vai além do tratamento de doenças respiratórias, podendo abranger doenças neurológicas desmielinizantes relacionadas a distúrbios de excitabilidade. Além disso, mais estudos são necessários para entender os mecanismos desses fármacos na redução da hiperexcitabilidade cerebral, principalmente em modelos de EM.

1.8 Justificativa

A EM é uma doença crônica e neurodegenerativa caracterizada pela desmielinização e degeneração axonal, resultando em uma série de déficits neurológicos que acometem principalmente indivíduos em idade produtiva da vida, tendo um grande impacto pessoal e social (WALTON et al., 2020). Muitos estudos têm sugerido que crises convulsivas são mais comuns em indivíduos com EM do que o esperado para a população geral (MARRIE et al., 2015; LAPATO et al., 2017), o que sugere uma conexão entre desmielinização e hiperexcitabilidade cerebral. Além disso, a presença de convulsões em pacientes com EM está associada à diminuição da função cognitiva, curso mais agressivo da doença e aceleração do tempo de incapacidade (LAPATO et al., 2017). No entanto, apesar da reconhecida prevalência de convulsões em pacientes com EM, a patogênese dessas crises ainda é pouco compreendida e pouco explorada na literatura. Estudos que investigam a relação entre desmielinização e hiperexcitabilidade cerebral são necessários para elucidar os mecanismos subjacentes e desenvolver estratégias terapêuticas eficazes.

Sabe-se que o CC, uma estrutura crítica para a transferência e integração de informações entre os hemisférios cerebrais, é frequentemente afetado pela desmielinização na EM (GEANMARTON et al., 1991), podendo culminar em generalização de crises convulsivas, que inicialmente são focais, para crises mais amplas (UNTERBERGER et al., 2016). Modelos experimentais utilizando a dieta com CPZ são amplamente empregados para induzir desmielinização no SNC (KIPP et al., 2009; WANG et al., 2013; KIPP et al., 2016), facilitando o estudo da patogênese e das possíveis intervenções terapêuticas.

Terapias medicamentosas que buscam preservar a bainha de mielina e reduzir a hiperexcitabilidade cerebral mostram-se promissoras para o tratamento da EM. Enquanto o fingolimode já é utilizado no tratamento da EM, o pranlucaste ainda não é empregado para essa condição. Realizar estudos que explorem o potencial do pranlucaste para tratar doenças desmielinizantes, comparando-o com o fingolimode, que já demonstrou grande eficácia no tratamento da EM, pode ser valioso para estabelecer novas opções terapêuticas para os diversos aspectos patológicos da doença. Além disso, não existem estudos na literatura que avaliem a proteção contra a hiperexcitabilidade cerebral utilizando esses fármacos em um modelo animal de EM com dieta contendo CPZ.

2. OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do tratamento com Pranlucaste ou Fingolimode na proteção contra desmielinização e hiperexcitabilidade cerebral em um modelo animal de EM.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Acompanhar o ganho de peso através da análise da variação ponderal dos animais ao longo do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- II. Analisar a proteção contra a desmielinização do CC através da quantificação da densidade de lipídeos por meio da coloração com Sudan Black e Fluoromielina, da quantificação da densidade de proteína básica de mielina por meio de imunohistoquímica para MBP, e da quantificação das fibras mielínicas a partir de cortes semifinos corados com azul de toluidina e ultrafinos após MET ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- III. Analisar as anormalidades de mielina associadas ao processo de desmielinização a partir de cortes ultrafinos após MET ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- IV. Analisar a funcionalidade das fibras mielínicas por meio da histomorfometria do corpo caloso, através da razão-g ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- V. Analisar a função sensitiva ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- VI. Analisar o perfil celular, associado à formação e preservação de mielina, através de imunohistoquímica para CC1 (marcador de OLs) e NG2 (marcador de progenitor de OL) no corpo caloso, e por meio da coloração com hematoxilina e eosina (HE) ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- VII. Analisar a predisposição a convulsões por meio da injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol (PTZ) ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente

à exposição à CPZ.

- VIII. Avaliar a concentração de íons de potássio, por método potenciométrico de análise química, liberados pelas células neuronais para o meio extracelular em fatias de tecido submetidas à cultura organotípica ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- IX. Analisar os segmentos excitáveis de axônios através de imunofluorescência anti-Nav1.6 ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.
- X. Analisar o peso e a área de polpa branca dos baços através da coloração por hematoxilina e eosina ao final do tratamento com pranlucaste ou fingolimode frente à exposição à CPZ.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

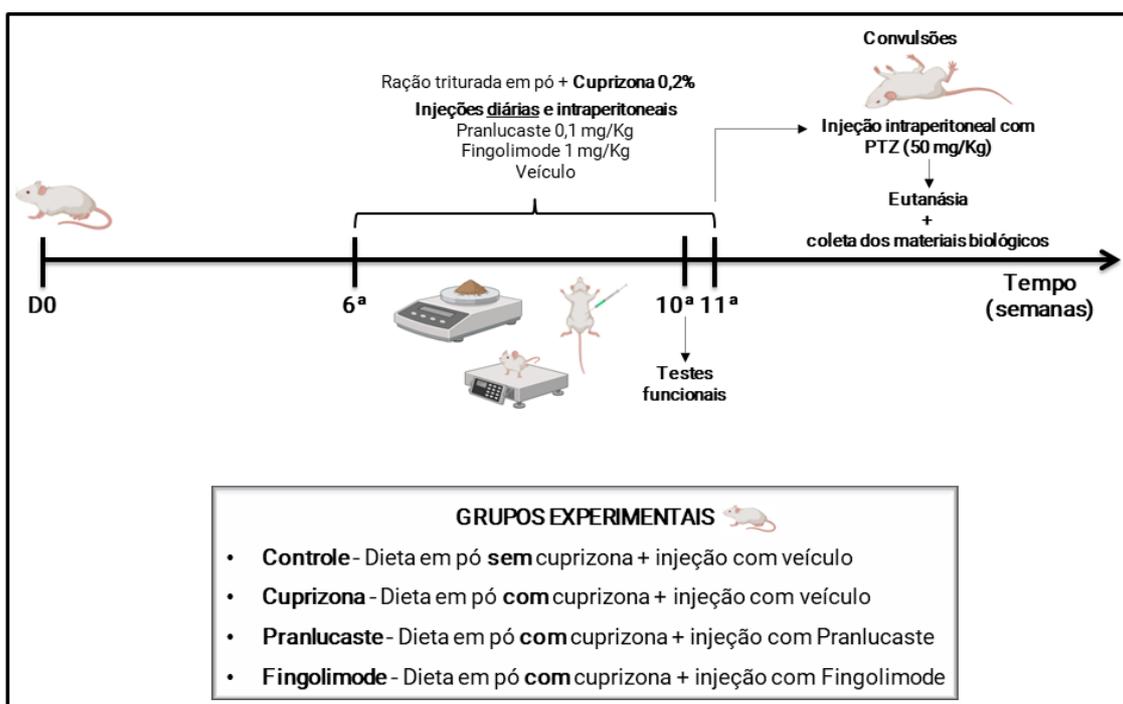
Camundongos suíços, machos e fêmeas, de peso 25-30 gramas, foram mantidos no biotério experimental do Instituto Macaé de Ciência e Tecnologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com controle de ciclo claro/escuro, sob ambiente ventilado e climatizado durante todo o período de experimentação. Todos os procedimentos experimentais obedecem às normas de utilização de animais de laboratório do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e às normas internacionais de experimentação animal. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob o número de referência MAC072.

3.2 Dieta com cuprizona

A dieta com CPZ (bis(cicloexanona)oxaldihidrazona; Sigma-Aldrich) foi realizada conforme realizado em trabalho publicado pela nossa equipe (ARAÚJO et al., 2017). Grupos de camundongos (Controle N=20; Cuprizona N=20; Pranlucaste N=17; Fingolimode N=13) selecionados para o tratamento foram submetidos à dieta com ou sem CPZ e pesados diariamente. Uma parte da ração triturada a pó (sem adição de CPZ) foi reservada, para tratamento do grupo controle, e a outra parte foi misturada com CPZ 0,2% para tratamento do restante dos grupos. O estoque de ração moída foi armazenado na geladeira e a dieta foi oferecida diariamente, em livre demanda, aos camundongos a partir de seis semanas de vida e foi mantida por cinco semanas.

3.3. Tratamento com Pranlucaste ou Fingolimode

Os camundongos foram pesados em balança eletrônica e seus pesos foram anotados diariamente. Após a pesagem, os animais receberam injeções intraperitoneais com pranlucaste (0,1 mg/kg; Cayman chemical) ou fingolimode (1mg/kg; Cayman chemical) diluídos em solução salina 0,9% durante todo o período de dieta com CPZ. Animais do grupo controle e CPZ, receberam as injeções apenas com veículo no mesmo período. A representação do modelo experimental está detalhada no esquema 1.



Esquema 1: Desenho do modelo experimental.

3.4. Teste funcional

No final da quarta semana de tratamento, os animais foram submetidos a teste funcional de sensibilidade que foi realizado após cegamento dos grupos por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

O teste de pressão crescente na pata foi realizado conforme estudo previamente publicado pela equipe executora da proposta (PESTANA et al., 2018). Esse teste é utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico tátil. O analgesímetro digital (Von Frey eletrônico) consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). A precisão do aparelho é de 0,1 g e foi calibrado para registrar uma força máxima de 150 g, mantendo a precisão de 0,1 g até a força de 80 g. O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado através de ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro. Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico com assoalho em rede de malha igual a 5 mm² constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização das plantas das patas dos animais. Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão

linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produzisse uma resposta caracterizada como sacudida da pata estimulada. O valor expresso no aparelho no momento da retirada da pata foi observado e anotado.

3.5 Verificação da predisposição a convulsões

No final da quinta semana do tratamento, as convulsões foram induzidas por injeção intraperitoneal de PTZ (Cayman chemical), em dose convulsiva e compatível com a vida (50 mg/kg), diluído em salina 0.9% e avolumada com 200 μ L de água destilada. Os animais foram colocados em arenas de campo aberto e filmados por um período de 0 a 10 minutos após administração do PTZ para análise posterior quanto à duração em cada fase comportamental.

A quantificação da intensidade das crises foi realizada a partir da Escala de Racine modificada. Esta consiste em comportamentos específicos para cada fase (Figura 9): 1 - Aprisionamento de olhar; 2 - Espasmos orofaciais; 3 - Arranco de pescoço; 4 - Convulsão clônica bilateral; 5 - Convulsão clônica unilateral; 6 - Convulsão tônica com manutenção postural; 7 - Convulsão tônica com perda postural; 8 - Convulsão tônica-clônica generalizada / salto selvagem (LÜTTJOHANN A et al., 2009; ERUM J. V. et al., 2019).

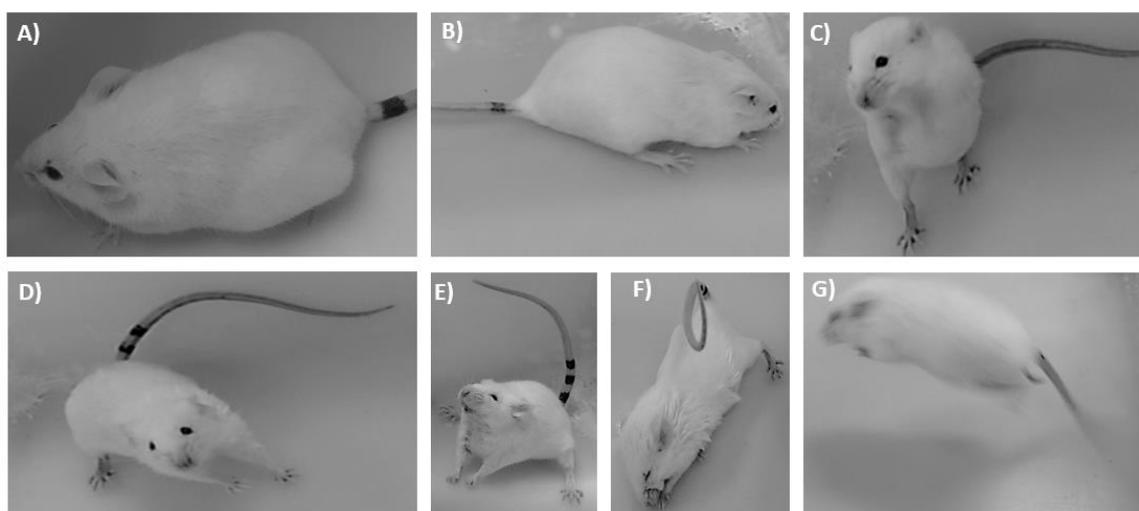


Figura 9. Fases da Escala de Racine modificada observada nos animais. (A) Fase 1 - Aprisionamento de olhar; (B) Fase 3 - Arranco de pescoço; (C) Fase 4 - Convulsão clônica bilateral; (D) Fase 5 - Convulsão clônica unilateral; (E) Fase 6 - Convulsão tônica com manutenção postural; (F) Fase 7 - Convulsão tônica com perda postural; (G) Fase 8 - Convulsão tônica-clônica generalizada / salto selvagem.

3.6 Imuno-histoquímica para marcadores específicos

As imuno-histoquímicas foram realizadas conforme trabalho previamente publicado pelo grupo (GOULART et al., 2018). Ao final das cinco semanas de tratamento, imediatamente após o teste de predisposição a convulsões, os animais foram profundamente anestesiados por injeção intraperitoneal de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) e perfundidos por via intracardíaca com solução fixadora de paraformaldeído (PFA) 4%. Os animais foram dissecados e seus encéfalos e baços foram recolhidos e mantidos em PFA 4%. Posteriormente, os encéfalos foram crioprotetidos em soluções de sacarose de concentrações crescentes de 20% e 30% (por 24 a 48 horas em cada uma), congelados em dióxido de carbono sólido (gelo seco) sob imersão por 20 minutos, e cortes histológicos coronais de 12 µm foram obtidos em criostato (Leica CM 1850) e coletados em lâminas previamente gelatinizadas e armazenados em freezer a -20°C. Então, os seguintes passos foram realizados: lavagem das lâminas em PBS (salina tamponada com fosfato), com pH = 7,4; Bloqueio da ligação a sítios inespecíficos com PBS contendo triton X-100 (0,3%) e 10% de soro normal de cabra; incubação por um pernoite com anticorpo primário anti-MBP (1:200), diluído em solução de bloqueio, exceto para os controles negativos; Lavagem com PBS e incubação com anticorpo secundário biotilado contra a espécie em que o primário foi produzido (diluído em solução de bloqueio); Bloqueio da atividade da Peroxidase endógena com incubação de 15 minutos em 0,3% de Peróxido de hidrogênio em Metanol; Lavagem em PBS e incubação com Kit ABC (Vector); Lavagem em PBS e revelação com Diaminobenzidina + Peróxido de hidrogênio; Desidratação em concentrações crescentes de Etanol, clarificação em Xilol e montagem das lâminas com entellan. As imagens foram capturadas no microscópio *Olympus BX51* (campo claro), com a objetiva de 20x, associado à câmera fotográfica digital. As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se o *software ImageJ*. O *plug-in* “*Mean gray value*” foi aplicado em cada imagem, a partir do qual foi obtida a densidade óptica que foi quantificada a partir da intensidade média de cada foto.

Para as imunofluorescências, as lâminas contendo as fatias foram lavadas em PBS (pH 7,4) por cinco minutos. Para a recuperação antigênica do tecido, as lâminas foram incubadas com solução SDS 1% (Sulfato dodecil de sódio) por cinco minutos, em seguida lavadas duas vezes em PBS. Para o bloqueio de ligação a sítios inespecíficos, foi utilizada uma solução de PBS contendo triton X-100 a 0,3%, e soro normal de burro/cabra (NDS, do inglês, *normal donkey serum*, e NGS, do inglês, *normal goat serum*, respectivamente) a 2,5%, por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, exceto para os controles negativos, os tecidos foram

incubados por um pernoite com anticorpo primário (anti-CC1, anti-NG2 e anti-Nav1.6) na solução de bloqueio e em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS três vezes por cinco minutos cada e, então, incubadas com anticorpo secundário por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em PBS quatro vezes por cinco minutos cada, e foi incubado o marcador *nuclear 4,6-diamino-2-phenylindole* (DAPI, 20mg/mL, *sigma*) por cinco minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas em PBS uma vez por cinco minutos, e montadas com meio de montagem *fluoromount* (*Eletron Microscopy Science*, cat.17984-25), armazenadas no freezer a -20°C para posterior análise. A ausência do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo da reação.

As imagens foram capturadas no microscópio confocal (SPE Leica), com a objetiva de 40x (anti-CC1 e anti-NG2) e 63x (anti-Nav1.6), em 3 áreas do corpo caloso (área A, B e C). A área A corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral -1,5 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2 mm; a área B corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral 0 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2,3 mm; a área C corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral +1,5 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2 mm. Tais coordenadas foram analisadas com auxílio do Atlas “*The mouse brain in stereotaxic coordinates*” (PAXINOS, G., & FRANKLIN, K. B. J., 2001). As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se o *software ImageJ* sendo realizada a contagem manual das células CC1 positivas, além da análise da área marcada e contagem de punctas Nav1.6 por meio do *plugin Puncta Analyzer 2.0*. Adicionalmente, foi realizada a quantificação quanto à intensidade de fluorescência do NG2 por meio do plug-in “*Mean gray value*” aplicado em cada imagem, a partir do qual foi obtida a densidade óptica que foi quantificada a partir da intensidade média de cada foto. Todas as análises foram realizadas após cegamento de todas as amostras por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

Tabela 1: Especificação de anticorpo primário utilizado na imuno-histoquímica.

| Anticorpo Primário | Espécie de origem | Diluição | Fabricante |
|--------------------|-------------------|----------|-----------------------------------|
| MBP | Rato | 1:200 | Millipore (MAB386) |
| APC [CC-1] | Camundongo | 1:100 | Abcam (ab16794) |
| NG2 | Coelho | 1:100 | Millipore (AB5320) |
| SCN8A (Nav1.6) | Camundongo | 1:100 | Sigma-Aldrich (WH0006334M4-100UG) |

Tabela 2: Especificação de anticorpo secundário utilizado na imuno-histoquímica.

| Anticorpo Secundário | Espécie de origem | Diluição | Fabricante |
|------------------------------------|-------------------|----------|---------------------------|
| Anti-Rat Biotinilado | Cabra | 1:300 | Vector (BA-9400) |
| Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Mouse | Burro | 1:500 | Molecular Probes (R37115) |
| Alexa Fluor 594 Donkey Anti-Rabbit | Burro | 1:500 | Molecular Probes (A21207) |

3.7 Coloração com Fluoromielina

Os cortes histológicos cerebrais coronais de 12 μm , obtidos em criostato (Leica CM 1850), coletados em lâminas previamente gelatinizadas e armazenados em freezer a -20°C , também foram utilizados para coloração com Fluoromielina. Para isso, as lâminas com o material foram mantidas por 10 minutos em estufa com temperatura de 56°C e, em seguida, lavadas em PBS com pH 7,4 por 20 minutos. Em seguida foi adicionada a solução com fluoromielina (*FluoroMyelinTM Green Fluorescent Myelin Stain – F34651 – Molecular Probes*) diluída em PBS (1:300) e, logo depois, as lâminas passaram por 3 lavagens de 5 minutos de PBS e montadas com *fluoromount*.

As imagens foram capturadas no microscópio confocal (SPE Leica), com a objetiva de 40x, em 3 áreas do corpo caloso (área A, B e C). A área A corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral -1,5 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2 mm; a área B corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral 0 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2,3 mm; a área C corresponde aproximadamente às coordenadas mediolateral +1,5 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +2 mm. Tais coordenadas foram analisadas com auxílio do Atlas “*The mouse brain in stereotaxic coordinates*” (PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J., 2001). As imagens digitalizadas foram analisadas utilizando-se o *software ImageJ* sendo realizada a quantificação quanto à intensidade de fluorescência por meio do plug-in “*Mean gray value*” aplicado em cada imagem, a partir do qual foi obtida a densidade óptica que foi quantificada a partir da intensidade média de cada foto. Todas as análises foram realizadas após cegamento de todas as amostras por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

3.8 Coloração com Sudan Black

Já foi demonstrado a utilização da coloração com Sudan Black como um método simples, de curta duração e não tóxico para avaliar o reparo da mielina em doenças desmielinizantes (INEICHEN et al., 2017). Dessa forma, as lâminas contendo as fatias de cérebros foram lavadas em PBS com pH 7,4 por cinco minutos. Em seguida foi adicionada a solução de Sudan Black 1% diluído em álcool 70% por 10 minutos no material e, logo depois, as lâminas foram lavadas uma vez com água destilada e montadas com N-propilgalato. As imagens foram digitalizadas em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX51), com aumento de 10x, associado à câmera fotográfica digital para análise, com utilização do *ImageJ*, e foram quantificadas a porcentagem de área corada e a densidade de coloração nos tecidos. A densidade de coloração foi realizada por meio do *plug-in* “*Mean gray value*” aplicado em cada imagem, a partir do qual foi obtida a densidade óptica, a qual foi quantificada a partir da intensidade média de cada foto. Todas as análises foram realizadas após cegamento de todas as amostras por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

3.9 Coloração com Hematoxilina e Eosina

As lâminas contendo as fatias de cérebros foram lavadas em água destilada por 1 minuto e em seguida mergulhadas em hematoxilina de Harris por 3 minutos. Logo, após foram lavadas novamente com água destilada e mergulhadas em eosina por 30 segundos. Em seguida foram desidratadas em concentrações crescentes de Etanol (70%, 90% e 100%), clarificadas em Xilol e montadas com entellan. As imagens foram digitalizadas em microscópio óptico de campo claro (Olympus BX51), em aumento de 40x, associado à câmera fotográfica digital para análise da morfologia tecidual por meio da contagem de condões celulares e número de células organizadas em cordões celulares, com utilização do programa *ImageJ*.

3.10 Processamento dos baços e coloração em Hematoxilina e Eosina

Foram coletados os baços dos animais de cada grupo após perfusão intracardíaca, armazenados em PFA 4%, para posterior pesagem em balança de precisão e realização do processamento para emblocamento em parafina. Este processamento foi feito seguindo as seguintes etapas: desidratação colocando as amostras, armazenadas em cassetes previamente identificados, por 30 minutos em cada banho de álcool com concentrações crescentes (50%, 70%, 80%, 90%, Absoluto I, Absoluto II e Absoluto III); 30 minutos em banho de solução

contendo metade de álcool absoluto e metade de xilol; clarificação colocando as amostras por 30 minutos em cada banho de xilol (Xilol I, Xilol II e Xilol III); impregnação por 20 minutos em cada banho de parafina (I, II e III); inclusão com parafina líquida utilizando molde de metal para formar os blocos para microtomia.

Os blocos de parafina foram cortados no micrótomo, em cortes coronais de 4 μm de espessura, e levados com o auxílio de uma pinça ao banho-maria à temperatura aproximada de 40 a 50°C para que as fitas de parafina se distendessem sobre a água, evitando a formação de dobras no tecido. Em seguida, os cortes foram pescados com lâminas de histologia previamente limpas e gelatinizadas.

As lâminas com os cortes realizados no micrótomo foram mantidas por 10 minutos em estufa com temperatura de 56°C, submetidas a desparafinização por 3 minutos em cada banho de xilol (xilol I, xilol II e xilol III), hidratação por 1 minuto em cada banho com solução de álcool em concentrações decrescentes (álcool absoluto, 90%, 80%, 70%), seguida de imersão em água destilada por 30 segundos, coloração com hematoxilina por 2 minutos, lavagem em água corrente por 3 minutos, coloração com eosina por 30 segundos e lavagem em água destilada. Logo após, as fatias nas lâminas foram desidratadas por 1 minuto em cada banho de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e álcool absoluto), clarificadas por 3 minutos em cada banho de xilol (xilol I, xilol II e xilol III) e montadas com Entellan.

A coloração com HE teve o intuito de permitir a contagem manual do número de nódulos linfóides e a quantificação da porcentagem da área de polpa branca, com a utilização do programa *ImageJ*. Todas as análises foram realizadas após cegamento de todas as amostras por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

3.11 Microscopia eletrônica de transmissão

A MET tem sido fundamental para elucidar a relação entre o axônio e sua bainha de mielina em condições normais e patológicas. No entanto, a MET requer cuidados específicos no preparo tecidual e interpretação das imagens, já que é comum a ocorrência de artefatos em processamento convencional das amostras de tecidos. Por isso, recomenda-se que todas as alterações encontradas devam ser interpretadas por meio de comparação dos grupos experimentais com o grupo controle (STASSART RM, MÖBIUS W, NAVE KA, EDGAR JM,

et al., 2018), o que foi realizado neste presente trabalho. O processamento para MET e os cortes semifinos e ultrafinos para análise da morfometria do SNC foram realizados conforme trabalho publicado previamente por membros da equipe (MENDONÇA et al., 2018).

Para a análise ultra-estrutural, os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca com PFA 4% e glutaraldeído (GA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M, no final da quinta semana de tratamento. Os cérebros foram seccionados em cortes parassagitais de 500 µm que foram obtidos a partir de vibrátomo (Vibratome Series 1000, Sectioning System), e de cada corte foi dissecada, com auxílio de bisturi, uma amostra contendo o CC. A área escolhida do CC correspondeu aproximadamente às coordenadas mediolateral +2,5 mm, anteroposterior 0 mm e dorsoventral +1.6 mm. Tais coordenadas foram analisadas com auxílio do Atlas “*The mouse brain in stereotaxic coordinates*” (PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J., 2001). Essas amostras foram deixadas em imersão numa solução fixadora fresca (GA 2,5% em Tampão Fosfato 0,1 M) por pelo menos 24 horas, e então processados para MET de rotina. Após a fixação por imersão nas soluções supracitadas, as amostras passaram por duas lavagens de cinco minutos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), seguida de duas lavagens de cinco minutos em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) e pós fixados por 2 horas em tetróxido de ósmio 1% contendo 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato a 0,1 M (pH 7,4). Os cortes foram lavados três vezes por cinco minutos em tampão cacodilato a 0,1 M (pH 7,4) e depois duas vezes por cinco minutos em água destilada. Foram colocados em uma solução de acetato de uranila a 1% e deixados nessa solução por um pernoite. No dia seguinte, as amostras foram desidratadas numa bateria gradual de acetona 30%, 50%, 70%, 80%, 90% (duas lavagens por dez minutos em cada concentração) e 100% (duas lavagens por vinte minutos em cada). Em seguida, foram infiltradas em resina Poly/Bed 812 (Polysciences) e acetona nas proporções (1:3 e 2:2) por um pernoite cada, e em resina 100% por 48 horas dentro da geladeira. Após esse tempo, as amostras foram emblocadas em moldes de silicone e deixadas em estufa a 60°C, por 48 horas, para polimerização da resina.

Cortes parassagitais semifinos (300 - 500 nm) do corpo caloso foram coletados em lâminas de vidro, corados com azul de toluidina e fotografados (aumento 100x) sob microscópio óptico de campo claro (Olympus BX51) acoplado a câmera fotográfica para análise qualitativa das fibras mielínicas ao longo da extensão do corpo caloso. Logo após a realização dos cortes semifinos, cortes ultrafinos (50 - 60 nm) foram coletados em grades de cobre que foram levadas ao microscópio eletrônico (Jem 1001, JEOL) para análise da

ultraestrutura. Nesta análise foram realizadas uma amostragem sistemática de imagens de 10-30 campos dos cortes transversais do corpo caloso, com magnificação de 15.000x; dessa forma, uma ampla extensão do material foi percorrida, com intuito de alcançar um valor de 300 – 500 fibras mielínicas no total.

Avaliamos os seguintes parâmetros: número de fibras mielínicas, número de fibras sem mielina, número de anormalidades da mielina, medidas das áreas das fibras mielínicas, dos axônios e da espessura da bainha de mielina, a partir do qual medimos a razão-g. Esta foi calculada utilizando-se o diâmetro do axônio dividido pelo diâmetro da fibra por meio do programa *MyelTracer*. Neste a área referente à língua interna foi excluída do cálculo. A razão-g foi calculada em um mínimo de 300 fibras por animal.

As razões-g são comumente calculadas em imagens de ME de amostras quimicamente fixadas e apesar da ampla aplicabilidade e relevância funcional, a razão-g normalmente negligencia a língua interna. No entanto, uma língua interna alargada enviesará a análise padrão da razão-g ao superestimar o diâmetro do axônio (CARRILLO-BARBERÀ et al., 2023). Conseqüentemente, neste trabalho, foi realizada a exclusão da área da língua interna durante o cálculo da razão-g por meio do programa *MyelTracer* (KAISER et al., 2021).

Os resultados foram analisados pelo programa *GraphPad Prism* 8.0 e as imagens foram analisadas no programa *ImageJ*. As alterações histomorfológicas encontradas foram comparadas com o grupo controle na tentativa de evitar contagem de possíveis artefatos gerados pelo processamento das amostras. Todas as análises foram realizadas após cegamento de todas as amostras por outro pesquisador do laboratório que desconhecia o significado de cada grupo experimental.

3.12 Cultura organotípica

A atividade excessiva vista em axônios desmielinizados pode promover hiperexcitabilidade cerebral. Dessa forma, foi estabelecida a hipótese de um aumento extracelular de potássio gerado durante a atividade epileptiforme capaz de ser amplificado pela presença de axônios sem revestimento de mielina apropriado (UVA et al., 2021).

Para analisar a concentração dos íons K^+ no meio extracelular e sua correlação com a

hiperexcitabilidade cerebral, realizamos um ensaio por meio de cultura organotípica. Para isso, os quatro grupos de animais (Controle N=9, CPZ N=9, Pranluaste N=6 e Fingolimode N=6) foram eutanasiados com isoflurano e o encéfalo foi dissecado imediatamente e colocado em meio de cultura suplementado gelado (Soro fetal bovino + Penicilina/estreptomicina + Glicose + Fungizon + DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12). Em seguida, foram realizados cortes de 300 μm no Chopper, colocados em meio de cultura suplementado e armazenados na geladeira por 30 minutos para eliminação das proteases. Logo após, as fatias foram plaqueadas dentro do fluxo horizontal com a utilização de membranas para cultura (Millicell - Cell Culture Inserts, 0.4 μm , 30 mm diameter), e foi adicionado 1 mL de meio de cultura suplementado e as placas foram mantidas na estufa (37°C) por 30 minutos. Foram utilizadas 4 fatias por membrana, sendo selecionadas sempre duas fatias mais anteriores e duas fatias mais posteriores. Após esse tempo, o meio de cultura das placas foi substituído por meio de cultura suplementado novo (nos poços controle) ou por meio de cultura com PTZ 30 mM. As placas foram mantidas por 10 minutos dentro da estufa (37°C). Em seguida, os meios de cultura foram guardados e posteriormente realizada análise bioquímica quanto à dosagem de potássio por meio potenciometria.

3.13 Dosagem da concentração de íons K^+ por potenciometria

Foi utilizado o Slide K^+ VITROS que é constituído por um elemento analítico de múltiplas camadas revestido por um suporte de poliéster que utiliza a potenciometria direta para a medição do potássio iônico. O slide é constituído por dois eletrodos seletivos de íon, cada um contendo valinomicina (um ionóforo de potássio), uma camada de referência e uma camada de prata e cloreto de prata revestidos por um suporte de poliéster. Foi aplicada uma gota da amostra do meio de cultura e uma gota do Líquido de Referência dos Eletrólitos VITROS em metades separadas da lâmina resultando numa migração dos dois líquidos para o centro da ponte de papel. Formou-se então uma junção estável do líquido, ligando o eletrodo de referência ao eletrodo indicador da amostra. Cada eletrodo produz um potencial elétrico em resposta à atividade do potássio aplicado ao mesmo. A diferença de potencial existente entre os dois eletrodos foi calculada e expressa em mEq/L.

3.14 Análise estatística

Todos os resultados foram comparados através do programa *GraphPad Prism* 8.0 e

foram apresentados em forma de média e erro padrão da média. A normalidade das amostras foi testada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Os valores do grupo controle foram normalizados para 1 e as diferenças dos tratamentos em relação ao controle foram estudadas com o Teste t de uma amostra. Os grupos tratados foram comparados entre si por meio do teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey. Na análise de variação ponderal e das convulsões pela Escala de Racine foi utilizado o Teste Two-Way Anova com pós-teste de Bonferroni. Na análise da quantidade de fibras em determinadas faixas de razão-g foi utilizado o Teste Two-Way Anova com pós-teste de Tukey. Na análise estatística da variação do potássio no meio de cultura após adição de PTZ no grupo controle e CPZ foi utilizado o teste t pareado. Na análise de área marcada para Nav1.6 foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Variação ponderal em relação ao início do tratamento dos animais

Os camundongos adultos jovens receberam diariamente, em livre demanda, ração triturada com CPZ 0,2% e ração triturada controle ao longo de cinco semanas. Para realizar o cálculo das doses dos fármacos aplicados diariamente e para acompanhamento do ganho de peso ao longo do tratamento, os animais foram pesados diariamente e realizou-se uma análise da variação ponderal em relação ao início do tratamento.

Sabe-se, pela literatura, que o tratamento com CPZ induz a um ganho de peso mais lento em relação ao grupo controle (SEN et al., 2020a), o que também foi visto nos animais deste atual trabalho, chegando a atingir pesos significativamente menores em relação ao controle no final do tratamento (35ª semana) (Figura 1).

Foi avaliado também como o tratamento com pranluaste e fingolimode interferiu no ganho de peso dos animais e concluiu-se que houve uma redução significativa do peso, em gramas, em relação ao grupo controle na 2ª semana de tratamento. Entretanto, ao final do tratamento esses dois grupos tiveram uma recuperação significativa do peso, ficando este semelhante ao do grupo controle (Figura 1).

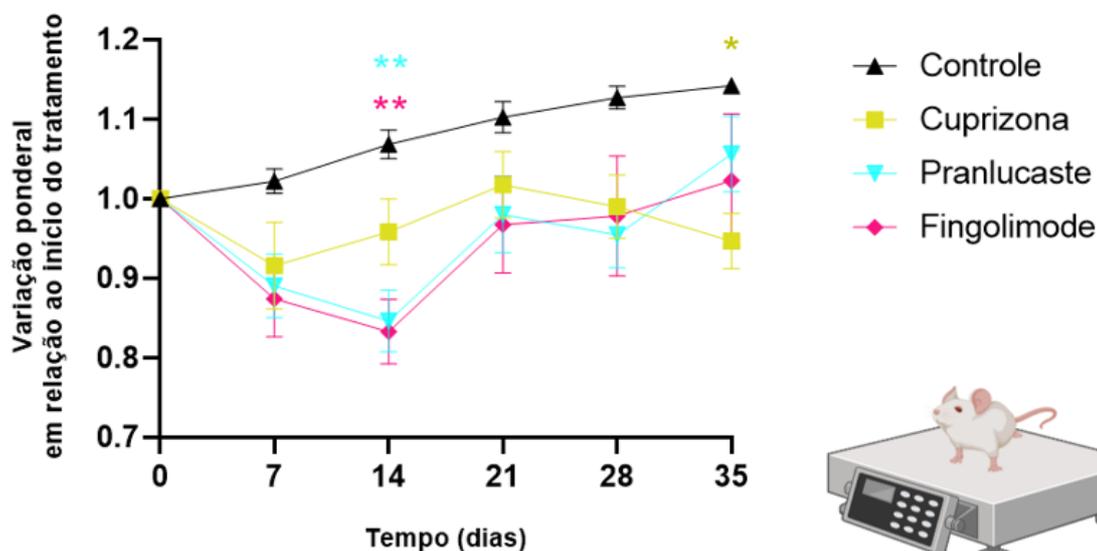


Figura 10 – Análise da variação ponderal em relação ao início do tratamento dos animais. Observe que o ganho de peso foi mais lento no grupo CPZ em relação ao controle, ocorrendo uma redução significativa na 35ª semana. Houve também redução significativa do peso na 14ª semana de tratamento com fingolimode e pranlucaste em relação ao controle, porém há uma recuperação do peso desses animais ao final do tratamento. Controle com n = 6; Cuprizona com n = 6; Pranlucaste com n = 6; Fingolimode com n = 6. *p < 0,05; **p < 0,01 em relação ao grupo controle. Teste two-way Anova com pós-teste de Bonferroni.

4.2 Dieta com 0,2% de CPZ induziu a desmielinização no corpo caloso e o tratamento com pranlucaste ou fingolimode protegeram contra a desmielinização

A região mais intensamente estudada para desmielinização após intoxicação por CPZ é o corpo caloso. Quando camundongos adultos são alimentados com 0,2% de CPZ na dieta, a desmielinização do corpo caloso começa a ocorrer na terceira semana de tratamento, atingindo um pico de perda de mielina na quinta semana de tratamento (MATSUSHIMA; MORELL, 2001). Dessa forma, o tempo de tratamento escolhido para os camundongos adultos jovens foi de cinco semanas e as análises no corpo caloso desses animais foram realizadas no final desse período, em que a desmielinização já estava bem consolidada.

Existem algumas técnicas de coloração e marcação de mielina baseadas em sua composição. Uma delas é a utilização de um corante fluorescente lipofílico, fluoromielina, que detecta seletivamente os componentes lipídicos da mielina (KILGORE J., 2006). Inicialmente realizamos essa técnica para análise da densidade dos lipídios de uma forma geral do corpo caloso, sabendo que a mielina possui uma preponderância na composição dessa estrutura

(POITELON et al., 2020). Vimos que ocorreu uma redução significativa na densidade de fluoromielina nos grupos CPZ e pranlucaste em relação ao controle e que há uma recuperação da densidade no grupo tratado com fingolimode (Figura 10, gráfico M).

Além disso, realizamos outra técnica para análise de densidade de lipídeos com coloração com Sudan Black, cuja utilização mostrou ser um método simples, de curta duração e não tóxico para avaliar o reparo da mielina em doenças desmielinizantes por meio da coloração de lipídeos (INEICHEN et al., 2017). Vimos que, no CC, no final da quinta semana de tratamento, a densidade de coloração diminuiu significativamente em todos os grupos em relação ao controle. O tratamento com fingolimode recuperou parcialmente o nível da densidade de coloração, já o tratamento com pranlucaste não levou à recuperação da densidade de coloração (Figura 10, gráfico N).

Ambas as análises realizadas anteriormente mostraram uma variação na quantidade de lipídios presentes no CC dos tecidos analisados. Entretanto, apesar da alta proporção de lipídios (70 – 85%), a bainha de mielina é formada também por proteínas, sendo que uma das mais abundantes é a MBP (POITELON, KOPEC e BELIN, 2020; JAHN et al., 2020). Dessa forma, para avaliação do outro componente constituinte da mielina, as proteínas, e para uma análise por meio de anticorpos específicos de mielina, realizamos imuno-histoquímica contra MBP no CC no final da quinta semana de tratamento, que mostrou uma diminuição significativa da densidade de MBP no grupo CPZ. Além disso, os tratamentos com Pranlucaste e Fingolimode recuperaram parcialmente o nível de mielinização (Figura 10, gráfico O).

Com esses resultados podemos concluir que reproduzimos um modelo animal de dieta com CPZ que apresentou desmielinização do CC no final da 5ª semana de tratamento. Além disso, observamos uma variação quanto à proteção contra a perda dos dois constituintes da mielina nos grupos tratados com os fármacos pranlucaste ou fingolimode. O pranlucaste não protegeu significativamente nesse período de tratamento contra a perda de lipídios, entretanto houve uma proteção quanto aos níveis de MBP no CC. Já o fingolimode foi capaz de proteger significativamente contra a perda de lipídeos e de MBP no CC.

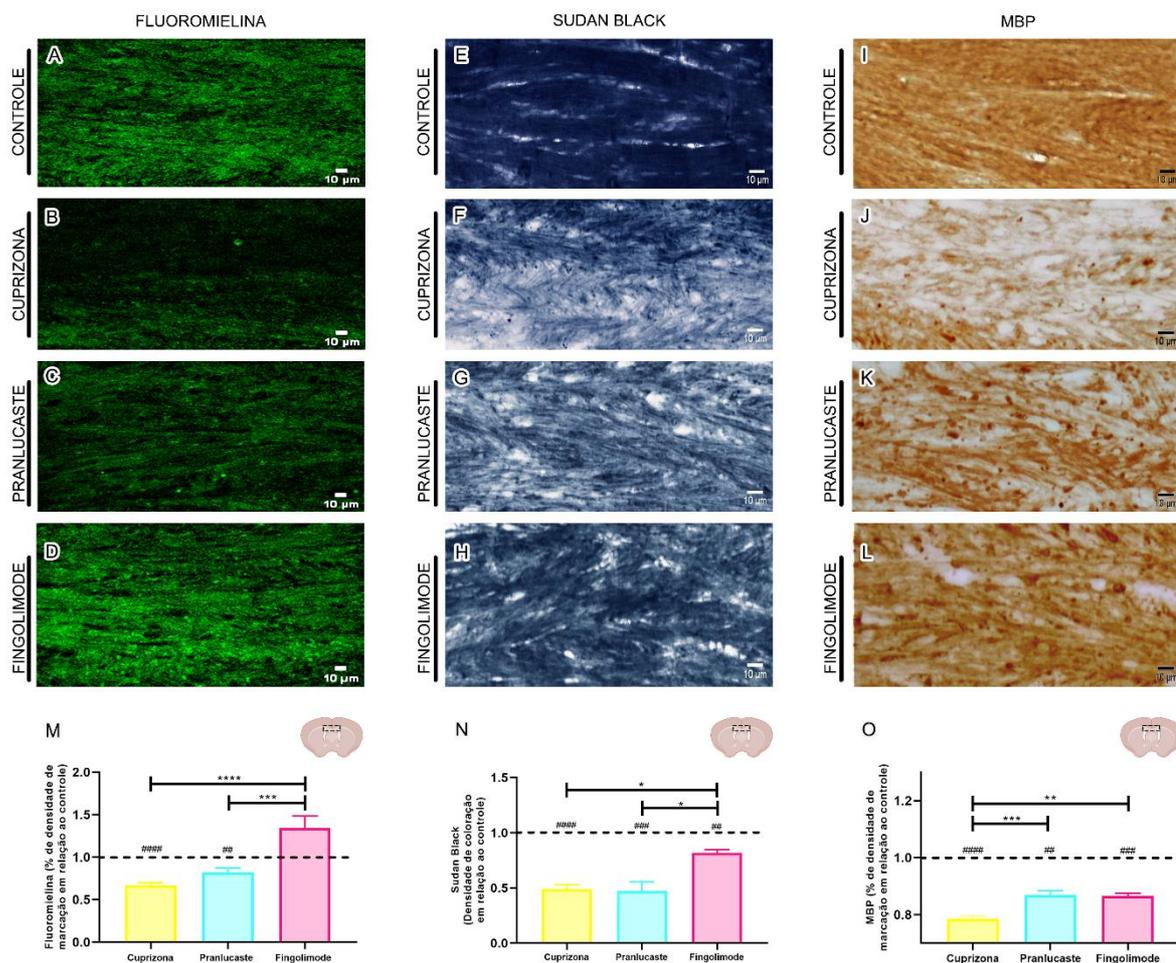


Figura 11. Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso quanto à densidade de fluoromielina (imagens A, B, C e D), quanto à densidade de coloração por Sudan Black (imagens E, F, G e H) e quanto à densidade de MBP (imagens I, J, K e L). Barra de escala = 10 µm.

Gráfico M. Quantificação da densidade de fluoromielina no corpo caloso dos grupos cuprizona, pranlukaste e fingolimode em relação ao grupo controle (normalizado para 1). Observe que há redução significativa da densidade de fluoromielina dos grupos cuprizona e pranlukaste em relação ao controle e que há uma recuperação da densidade no grupo tratado com fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 7; Cuprizona com n = 8; Pranlukaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ####p < 0.0001, ##p < 0.05 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1) e ***p < 0,001, ****p < 0,0001 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

Gráfico N. Quantificação da densidade de coloração de Sudan Black no corpo caloso dos grupos cuprizona, pranlukaste e fingolimode em relação ao grupo controle (normalizado para 1). Observe que há redução significativa da densidade de coloração dos grupos em relação ao controle e que há uma recuperação parcial da densidade de coloração no grupo tratado com fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; Cuprizona com n = 8; Pranlukaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ####p < 0.0001, ###p < 0.0005, #p < 0.05 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1) e *p < 0,05 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

Gráfico O. Quantificação da densidade de proteína básica de mielina no corpo caloso dos grupos cuprizona, pranlukaste e fingolimode em relação ao grupo controle (normalizado para 1). Observe que há redução significativa

da densidade de proteína básica de mielina no corpo caloso dos grupos em relação ao controle e que há uma recuperação parcial da densidade de marcação nos grupos tratados com pranlucaeste e fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; Cuprizona com n = 7; Pranlucaeste com n = 5; Fingolimode com n = 4). #####p < 0.0001, ###p = 0.0005, ##p < 0.005 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1) e **p < 0,05, ***p < 0,005 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

4.3 Dieta com 0,2% de CPZ e o tratamento com fingolimode diminuiu e preservou respectivamente, o número de fibras mielínicas no corpo caloso

Cortes parassagitais semifinos do corpo caloso coletados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina evidenciaram uma redução qualitativa das fibras mielínicas no grupo CPZ, enquanto os tratamentos com pranlucaeste ou fingolimode parecem ter protegido parcialmente contra a perda de fibras mielínicas (Figura 12).

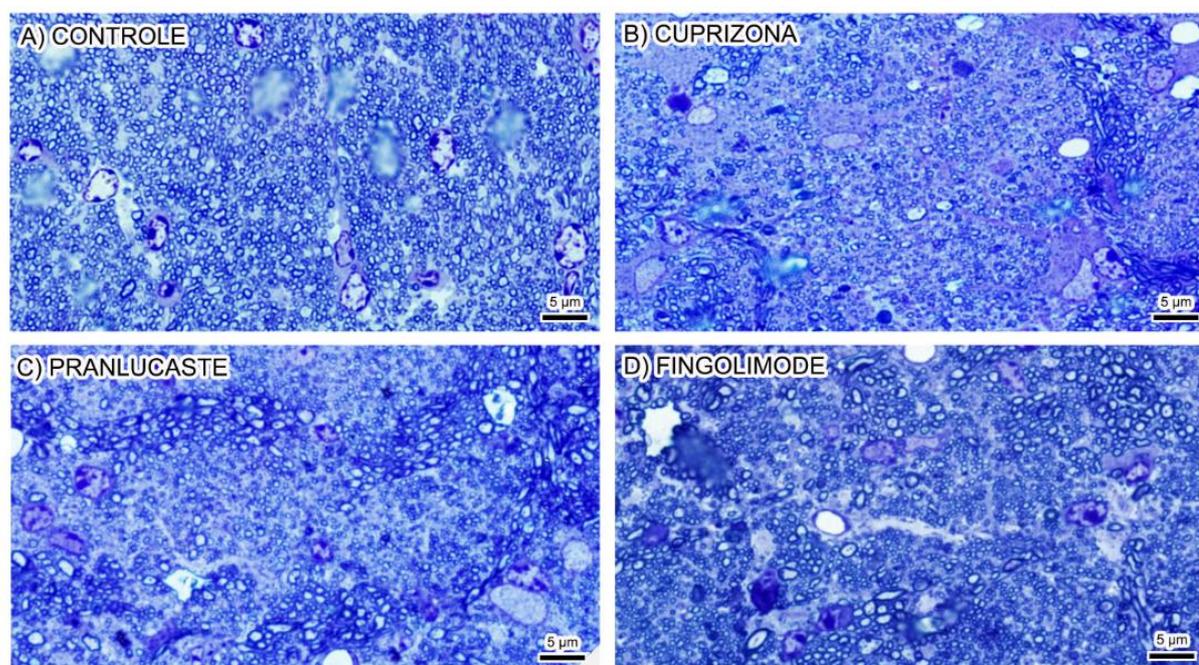


Figura 12. Cortes semifinos parassagitais do corpo caloso de cada grupo, mostrando as fibras mielínicas em cortes transversais em cada respectivo grupo. (N = 3 para cada grupo). Coloração: Azul de toluidina. Barra de escala = 5 µm.

Com a MET é possível estudar com mais detalhes as fibras mielínicas e sem mielina (PÉRIER, O.; GRÉGOIRE, A., 1965), o que é importante para investigar como a desmielinização afeta a estrutura da mielina, causando as diferentes manifestações neurológicas em doenças desmielinizantes como a EM. Dessa forma, após a realização dos cortes semifinos seguimos com

os cortes ultrafinos no mesmo material e inicialmente optamos por contar o número de fibras mielínicas e sem mielina. Começamos analisando a distribuição das fibras nervosas, contando manualmente as fibras mielínicas e sem mielina nas áreas analisadas do corpo caloso e vimos que não houve diferença significativa no número total de fibras em relação à unidade de área analisada (Figura 13, gráfico E). Concluímos assim que a distribuição das fibras se mostrou de forma significativamente homogênea.

Logo após, quantificamos o número de fibras mielínicas em relação à unidade de área analisada e observamos uma redução significativa dessas fibras do grupo CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle. Entretanto, o tratamento com fingolimode permitiu, significativamente, a preservação parcial das fibras mielínicas, o que não foi observado em relação ao tratamento com pranlucaste (Figura 13, gráfico F).

Esses resultados por meio da ultraestrutura mostram que a intoxicação com CPZ gera a desmielinização por meio da redução no número de fibras mielínicas e que o tratamento com fingolimode foi capaz de proteger parcialmente contra a perda dessas fibras, diferente do que foi visto no tratamento com pranlucaste.

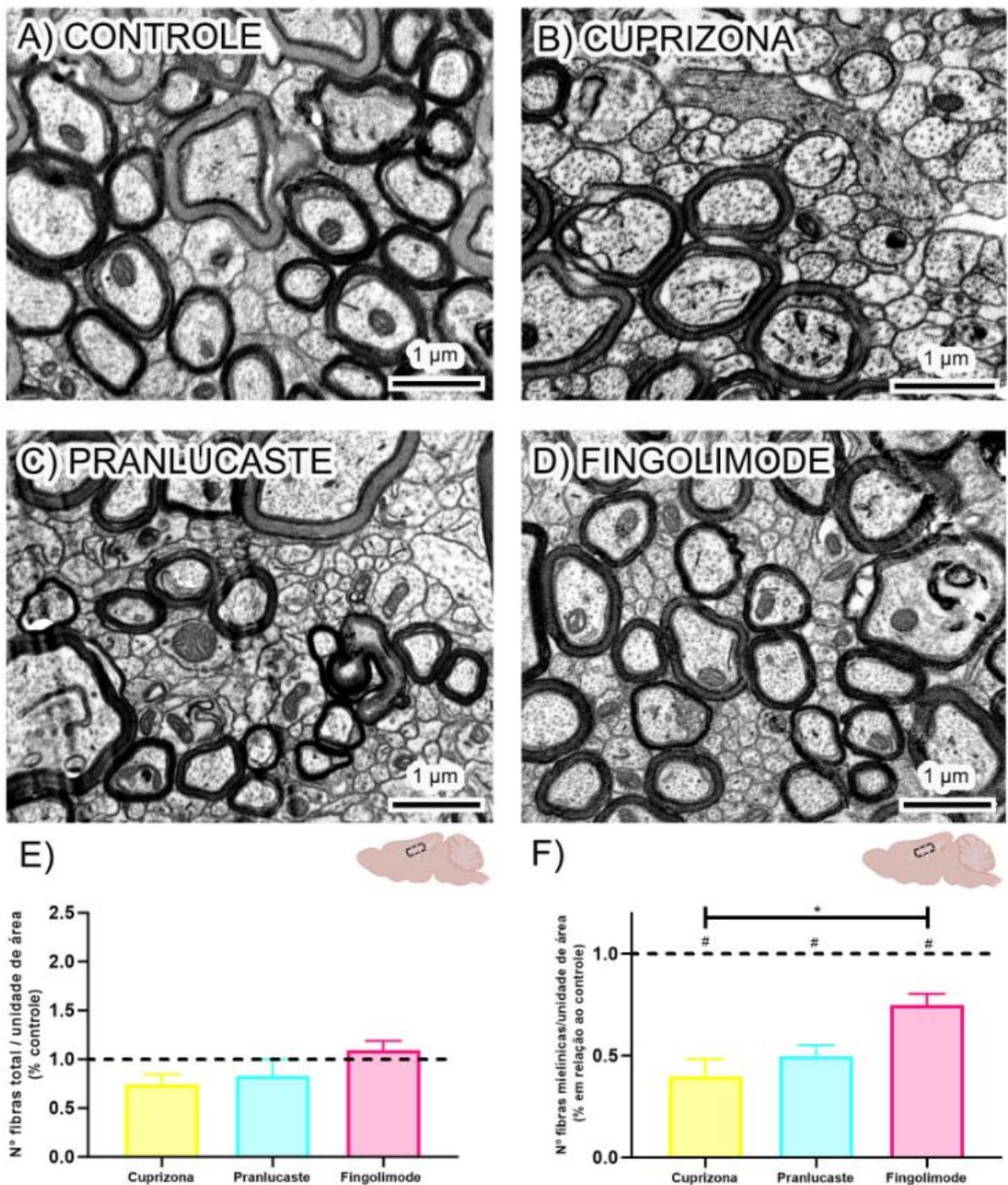


Figura 13. Cortes ultrafinos parassagitais do corpo caloso de cada grupo, mostrando as fibras mielínicas e sem mielina (amielínicas e desmielinizadas) em cortes transversais. Barra de escala = 1 μ m.

Gráfico E. Quantificação da distribuição do número de fibras totais (mielínicas e sem mielina) na área analisada dos grupos em relação ao controle (normalizado para 1). Observe que não há diferença significativa na distribuição do número de fibras totais em relação à unidade de área analisada entre os grupos. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). Teste t de uma amostra (em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

Gráfico F. Quantificação do número de fibras mielínicas em relação à unidade de área analisada dos grupos em relação ao controle (normalizado para 1). Observe que o número de fibras mielínicas é significativamente menor nos

três grupos experimentais em relação ao controle e que há uma recuperação parcial do número de fibras mielínicas no grupo tratado com fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). #p < 0,05 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1) e *p < 0,05 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

4.4 Dieta com 0,2% de CPZ levou a um aumento no número de anormalidades de mielina no corpo caloso

A bainha de mielina é caracterizada por uma estrutura multilamelar ao redor dos axônios, formada por OLs que envolvem e compactam múltiplas camadas de membranas ao redor do axônio. Entre o axônio e a camada mais interna de mielina encontra-se a língua interna, onde ocorre a incorporação da membrana de mielina e o espaço periaxonal extracelular, que juntamente com os canais mielínicos é importante para o suporte metabólico axonal. Essas áreas, possivelmente críticas para a patologia da EM, só são visíveis no nível ultraestrutural (VAN DEN BOSCH et al., 2023). Dessa forma, utilizamos os cortes ultrafinos para observar achados morfológicos caracterizados como anormalidades de mielina, presentes durante a desmielinização. Dentre elas destacaram-se a desorganização da mielina (Figura 14, B e C), a presença de vesículas na língua interna da mielina (Figura 14, B) e degeneração da língua interna (porção distal do prolongamento do OL) (Figura 14, D), conforme já descrito na literatura em modelos de desmielinização (BLAKEMORE, 1973; JOHNSON; LUDWIN, 1981; RODRIGUEZ et al., 1993) Essas anormalidades de mielina mostraram-se significativamente aumentadas no grupo CPZ e não houve diferença estatisticamente significativa no número de fibras com anormalidade de mielina nos grupos tratados com pranlucaste ou fingolimode em relação ao controle (Figura 14, gráfico E).

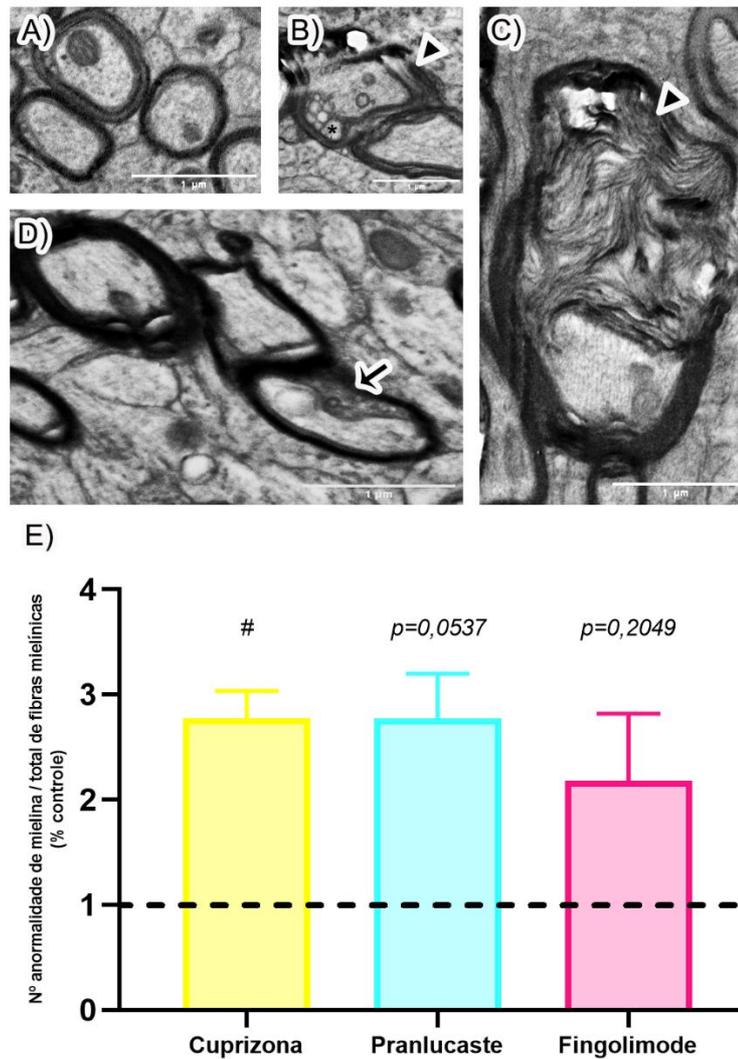


Figura 14. Análise de anormalidades de mielina. Cortes ultrafinos parassagitais do corpo caloso, mostrando as fibras mielínicas normais no grupo controle (A), presença de vacúolos na mielina indicados pelo asterísco (B), desorganização da mielina indicadas pelas cabeças de seta (B e C) e degeneração da língua interna indicada pela seta (D). Barra de escala = 1 μ m.

Gráfico E. Quantificação do número de anormalidades de mielina em relação ao total de fibras mielínicas dos grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao controle (normalizado para 1). Observe que o número de anormalidades de mielina é significativamente maior no grupo CPZ em relação ao grupo controle. Não houve diferença estatística significativa em relação ao controle quanto ao número de fibras com anormalidade de mielina nos grupos tratados com pranlucaste e fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). # $p < 0,05$ (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

4.5 Dieta com 0,2% de CPZ diminuiu e o tratamento com fingolimode preservou o número de fibras com a razão-g na faixa ideal

A razão entre o diâmetro do axônio e o diâmetro da fibra, conhecida como razão-g, é amplamente empregada como um indicador funcional e estrutural para avaliar a mielinização axonal ideal. De acordo com dados da literatura, sabe-se que a razão-g ideal para um axônio normalmente mielinizado se encontra na faixa 0.75 – 0.81 na região do corpo caloso de ratos. (CHOMIAK; HU, 2009). Em camundongos saudáveis, observou-se que a média da razão-g das fibras mielínicas no CC foi de 0,76 (XIU et al., 2017).

Após a contagem do número de fibras e das anormalidades de mielina, analisamos a funcionalidade das fibras mielínicas por meio da razão-g. Esta foi determinada por meio do programa *MyelTracer* que possibilitou a exclusão da área da língua interna, permitindo uma melhor precisão do cálculo.

A análise da razão-g mostrou que houve uma redução significativa na porcentagem de fibras mielínicas na faixa ideal, de 0.75 – 0.81, no grupo CPZ e no grupo pranlucaste em relação ao grupo controle. Já o tratamento com fingolimode induziu à recuperação da porcentagem de fibras mielínicas com razão na faixa ideal (0.75 – 0.81).

Não houve diferença significativa entre os grupos na faixa 0.68 – 0.74 em que prevaleceu a maior quantidade das fibras em relação ao total de fibras mielínicas analisadas. Nas outras faixas analisadas também não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 15, gráfico A).

Não houve diferença significativa em relação à área do axônio e a área da fibra entre os grupos (Figura 15, gráfico B e D). Entretanto, o grupo pranlucaste apresentou uma redução significativa da área de mielina em relação ao grupo controle (Figura 15, gráfico C). A média da razão-g também não mostrou diferença significativa entre os grupos, variando de 0,68 a 0,72 (Figura 15, gráfico D).

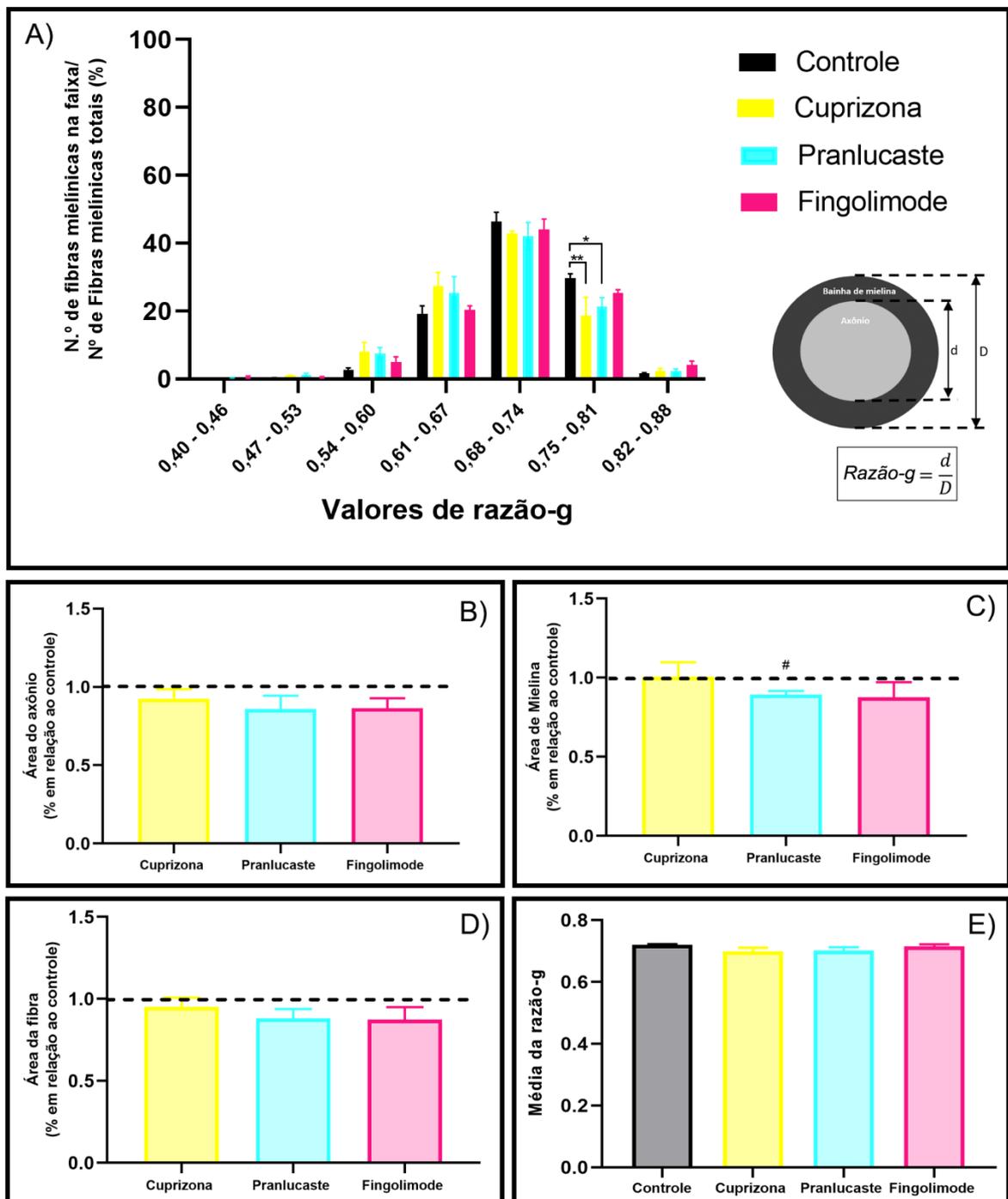


Figura 15. Análise estatística da razão-g, área do axônio, área da mielina e área das fibras.

Gráfico A. Quantificação da razão-g. O grupo tratado com fingolimode apresentou uma maior porcentagem de fibras mielínicas dentro da faixa 0,75 – 0,81, enquanto o contrário foi visto nos grupos CPZ e pranlucaste. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). *p < 0,05; **p < 0,005 (Teste Two-Way Anova com pós-teste de Tukey).

Gráficos B, C e D. Quantificação da área do axônio (B), da mielina (C) e da fibra mielínica (D). Não houve diferença significativa entre os grupos, exceto na análise da área de mielina que demonstrou uma redução significativa no grupo pranlucaste em relação ao controle. Os gráficos representam a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). #p < 0,05 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-

Way Anova com pós-teste de Tukey.

Gráfico E. Quantificação da média da razão-g em cada grupo experimental. Não houve diferença significativa entre os grupos. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (N = 3 para cada grupo). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

4.6 Dieta com 0,2% de CPZ gerou déficits de sensibilidade tátil nos camundongos, enquanto os tratamentos com pranlucaeste ou fingolimode protegeram parcialmente contra distúrbios sensoriais

Como o pico da desmielinização do corpo caloso ocorre na quinta semana de intoxicação por CPZ (MATSUSHIMA; MORELL, 2001), foi realizada a avaliação da presença de déficit de sensibilidade tátil nos camundongos nesse mesmo período por meio do analgesímetro digital.

Todos os grupos experimentais apresentaram aumento no limiar de retirada em comparação ao grupo controle. Entretanto, o houve um aumento significativamente maior no grupo CPZ em relação aos grupos tratados com pranlucaeste ou fingolimode (Figura 16). Assim, conclui-se que os animais significativamente desmielinizados apresentam déficit sensitivo, enquanto o tratamento com pranlucaeste ou fingolimode simultaneamente à dieta com CPZ recupera parcialmente a sensibilidade tátil dos animais.

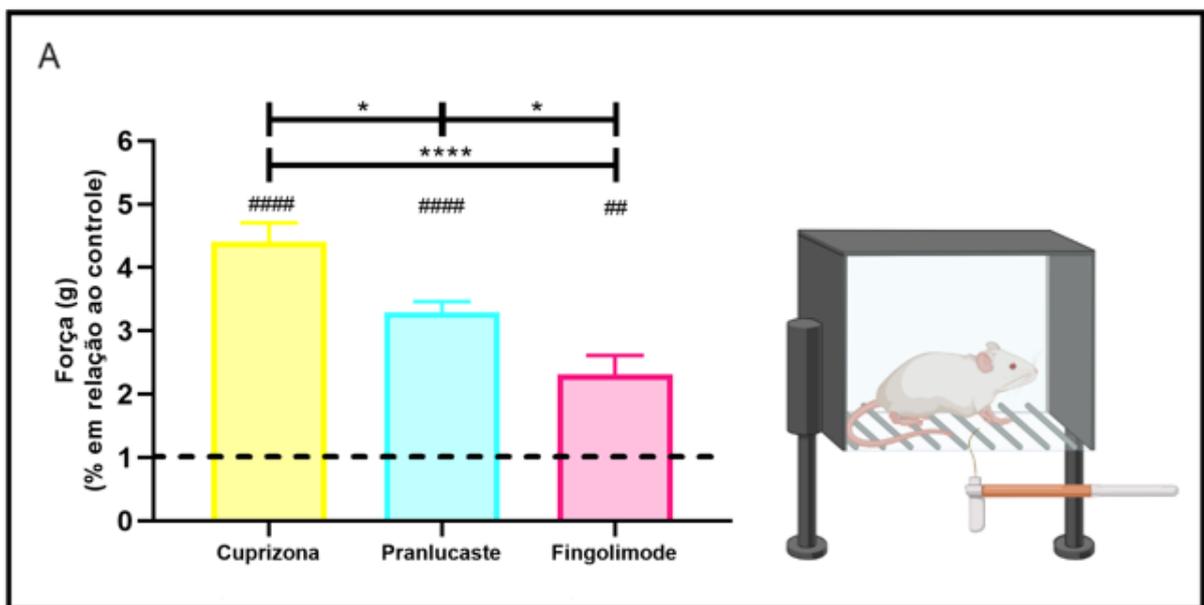


Figura 16. Teste de Pressão Crescente na Pata (Analgésímetro Digital). Gráfico A mostrando a quantificação do Teste de Pressão Crescente na Pata em que há uma perda significativa da sensibilidade no grupo CPZ e uma recuperação parcial nos grupos tratados com pranlucaeste ou fingolimode. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o

erro padrão da média (Controle com n = 8; CPZ com n = 8; Pranluaste com n = 7; Fingolimode com n = 8). ^{##}p < 0.005; ^{####}p < 0.0001 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). *p < 0.05; ****p < 0.0001 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

4.7 A desmielinização do corpo caloso prolongou a duração da convulsão em camundongos, enquanto os tratamentos com pranluaste ou fingolimode protegeram contra a hiperexcitabilidade cerebral

A quantificação das crises convulsivas foi realizada a partir de vídeos (gravados por 10 minutos) dos animais dos 4 grupos colocados em arenas de campo aberto após a aplicação de PTZ (50 mg/Kg). As convulsões possuem fases estereotipadas que variaram de mais graves para menos graves de acordo com a Escala de Racine modificada que consiste em comportamentos específicos para cada fase: 1 - Aprisionamento de olhar; 2 - Espasmos orofaciais; 3 - Arranco de pescoço; 4 - Convulsão clônica bilateral; 5 - Convulsão clônica unilateral; 6 - Convulsão tônica com manutenção postural; 7 - Convulsão tônica com perda postural; 8 - Convulsão tônica-clônica generalizada (LÜTTJOHANN, A. et al., 2009; ERUM J. V. et al., 2019). A partir disso foi possível observar que os animais do grupo CPZ permaneceram mais tempo em uma fase mais severa (fase 6 – crise tônica pura), enquanto os animais tratados com pranluaste e fingolimode obtiveram uma reversão da duração de convulsão a níveis semelhantes ao do grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos nas outras fases analisadas (Figura 17).

Devido à dificuldade de diferenciar a fase 1 do comportamento natural do animal, optamos por não a quantificar. A fase 2 (movimento de focinho) não foi observada nos vídeos gravados e, por isso, também não foi quantificada.

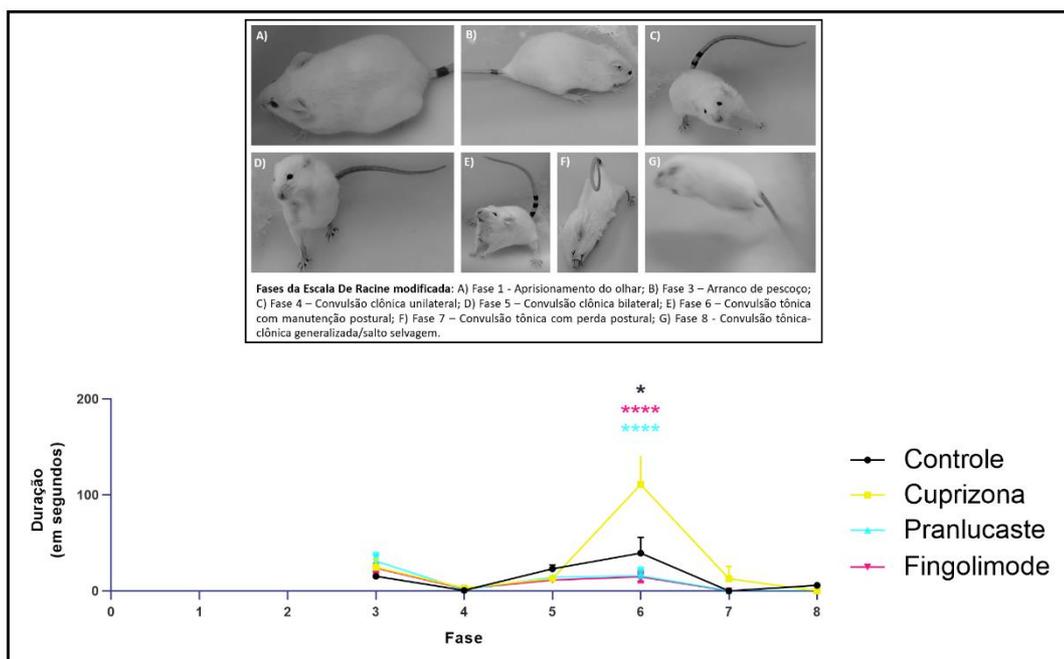


Figura 17. Quantificação das crises convulsivas analisadas pela Escala de Racine modificada. Imagens representativas das fases da Escala de Racine modificada. O gráfico representa a quantificação das crises convulsivas analisadas pela Escala de Racine modificada quanto ao tempo de duração em cada fase. Observa-se que os animais do grupo CPZ permanecem mais tempo na fase 6, enquanto os animais tratados com pranlucaste e fingolimode permaneceram por tempo semelhante ao do grupo controle. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- erro padrão da média (N = 8 para cada grupo). * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$ (Teste Two-Way Anova com pós-teste de Bonferroni).

4.8 Dieta com 0,2% de CPZ levou a uma desorganização da citoarquitetura do corpo caloso

Para análise comparativa da morfologia tecidual entre os grupos, com foco nas alterações oligodendrogliais, foi utilizada coloração de HE nos encéfalos. Observamos, no CC, a presença de abundantes e organizados cordões celulares característicos de glia interfascicular no grupo controle (Figura 18, A) e uma desorganização desses no grupo CPZ (Figura 18, B). Entretanto, a análise qualitativa sugere que esses cordões celulares se tornam ligeiramente organizados nos grupos tratados com fingolimode (Figura 18, D) e com pranlucaste (Figura 18, C). Além disso, é possível visualizar, no CC, células com redução acentuada do volume celular e picnose nuclear, sugerindo apoptose, nos animais submetidos à dieta com CPZ (grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode) que também foram observadas em outros trabalhos já publicados (KIPP et al., 2011; CHRZANOWSKI et al., 2019; ZHAN et al., 2020).

Visto que os OLs interfasciculares são células abundantes no CC e que eles se organizam

em cadeias celulares características (LEVY-MOZZICONACCI et al., 1998), após a análise qualitativa, foi avaliado o número de cordões celulares e o número de células organizadas em cordões no CC dos animais. Foi visto que o número de cordões celulares foi significativamente inferior nos grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle (Figura 18, gráfico E). Além disso, o número de células organizadas em cordões celulares também foi significativamente inferior nos grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle (Figura 18, gráfico F).

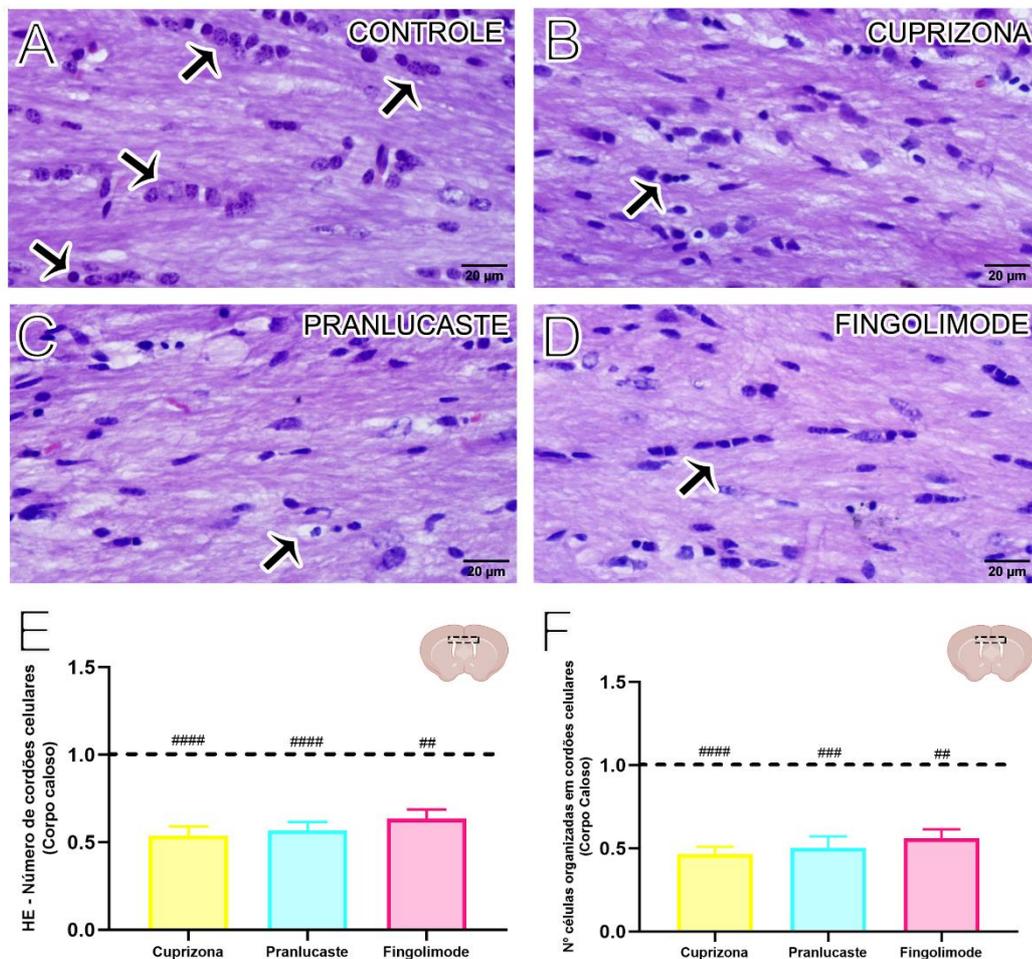


Figura 18. Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso coradas com HE (A, B, C e D) mostrando a presença de cordões celulares (setas), claramente mais abundantes e organizados no grupo controle, além de uma robusta desorganização no grupo cuprizona. Barra de escala = 20 µm.

Gráfico E. Quantificação do número de cordões celulares. Observa-se redução significativa do número de cordões celulares em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 8; CPZ com n = 8; Pranlucaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ##p < 0.005; ####p < 0.0001 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

Gráfico F. Quantificação do número de células organizadas em cordões celulares. Observa-se redução significativa

do número de células organizadas em cordões celulares em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 8; CPZ com n = 8; Pranlucaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ##p < 0.005; ###p < 0.0005; ####p < 0.0001 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

4.9 Dieta com 0,2% de CPZ diminuiu o número de oligodendrócitos, enquanto o tratamento com pranlucaste ou fingolimode não protegeram contra a perda dessas células no corpo caloso

Após a análise da organização da citoarquitetura nos grupos experimentais por meio da coloração de HE, realizamos uma análise celular mais específica por meio de imunofluorescência contra OLs maduros.

Os resultados da imunofluorescência anti-CC1 no CC mostraram que a intoxicação com CPZ levou à morte de OLs maduros, culminando com menor porcentagem de células CC1 positivas em relação ao grupo controle. Porém, o tratamento com pranlucaste ou fingolimode não aumentou o número células CC1 positivas em relação ao grupo CPZ (Figura 19, gráfico Q). Isso indica que os dois fármacos utilizados não protegeram contra a perda de OLs no CC durante as cinco semanas de tratamento.

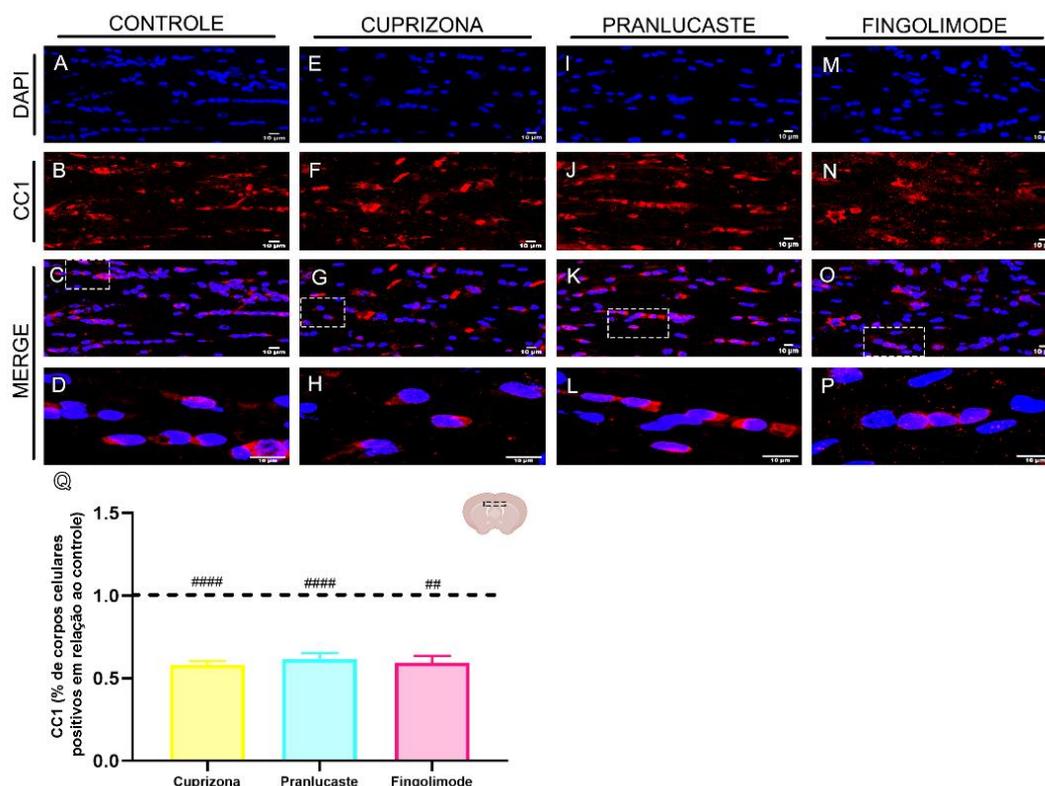


Figura 19. Imunofluorescência anti-CC1. Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso (A – O) quanto à porcentagem de corpos celulares de OLs (vermelho). Imagens ampliadas das células CC1 positivas marcadas em vermelho (D, H, L e P). Barra de escala = 10 µm.

Gráfico Q. Análise estatística da porcentagem de corpos celulares de OLs no corpo caloso dos grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle. Observa-se redução significativa do número de células CC1 positivas em todos os grupos experimentais em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; CPZ com n = 8; Pranlucaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ##p < 0.005; ####p < 0.0001 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

4.10 Dieta com 0,2% de CPZ aumentou o número de progenitores de oligodendrócitos no corpo caloso, o que não ocorreu após tratamento com pranlucaste ou fingolimode

Sabe-se que as OPCs são importantes para o processo de remielinização já que se diferenciam em OLs maduros após migrarem em direção ao local da lesão (MOYON et al., 2015; FRANKLIN e FFRENCH-CONSTANT, 2017). Elas são caracterizadas por altos níveis de expressão de marcadores específicos, como o marcador NG2, que é o motivo pelo qual também são chamadas de células NG2 positivas (PÉREZ-CERDÁ, F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; MATUTE, C., 2015).

Dessa forma, foi realizada imunofluorescência anti-NG2 com intuito de analisar a densidade dessa população celular nos grupos experimentais. O grupo CPZ apresentou um aumento significativo na intensidade de marcação para NG2 em relação ao grupo controle, enquanto os grupos pranlucaste e fingolimode apresentaram redução significativa na intensidade de marcação para NG2 em relação ao grupo CPZ (Figura 20, gráfico Q).

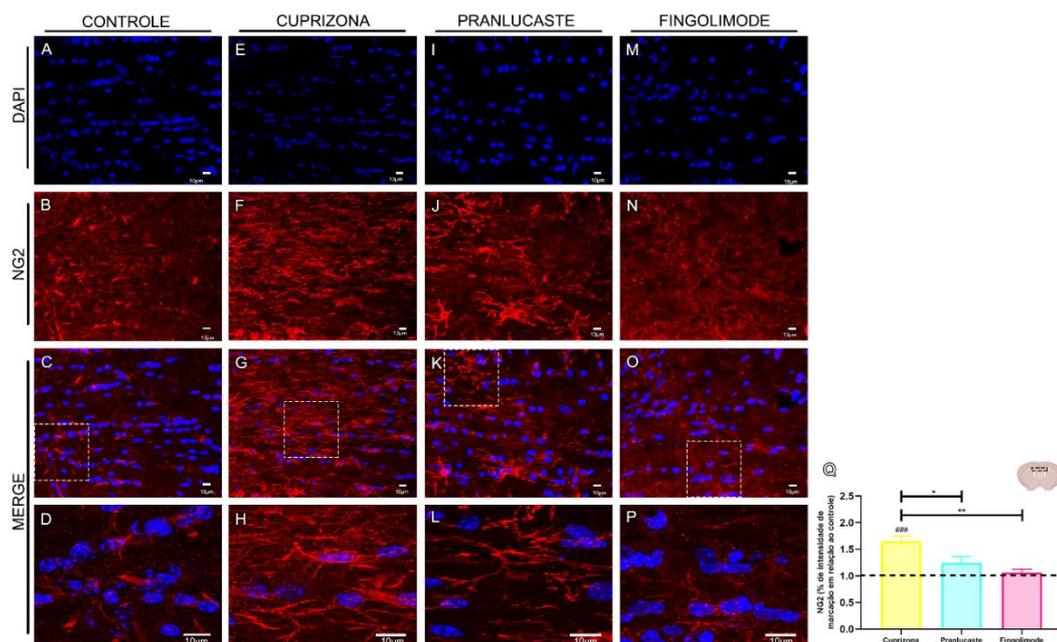


Figura 20. Imunofluorescência anti-NG2. Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso (A – O) quanto à intensidade de marcação para NG2 (vermelho). Imagens ampliadas da marcação para NG2 em vermelho (D, H, L e P). Barra de escala = 10 μ m.

Gráfico Q. Análise estatística da porcentagem de intensidade de marcação para OPC's no corpo caloso dos grupos CPZ, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle. Observa-se aumento significativo da intensidade de marcação no grupo CPZ em comparação ao grupo controle (normalizado para 1) e uma redução significativa nos grupos pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo CPZ. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; CPZ com n = 8; Pranlucaste com n = 8; Fingolimode com n = 4). ###p < 0.005 (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). *p < 0.05; **p < 0.01 (Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey).

4.11 O tratamento com pranlucaste ou fingolimode diminuiu a concentração de íons de potássio extracelular em ensaio de cultura organotípica

Com intuito de melhor elucidar a relação da hiperexcitabilidade cerebral com aumentos patológicos de potássio no meio extracelular, realizamos a análise desse íon por meio de cultura organotípica. Primeiramente mostramos que a adição de PTZ (30 mM) no meio de cultura levou

a um aumento significativo na concentração (mEq/L) de íons potássio no meio extracelular dos grupos controle e CPZ (Figura 21, A, B e C).

Após verificar que a adição de PTZ no meio de cultura em contato com o tecido cerebral é capaz de alterar significativamente a concentração de potássio, analisamos a concentração de potássio para os diferentes grupos experimentais. Os grupos tratados com pranlucaste e fingolimode foram capazes de reduzir significativamente a concentração de íons potássio em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos CPZ e controle (Figura 21, D).

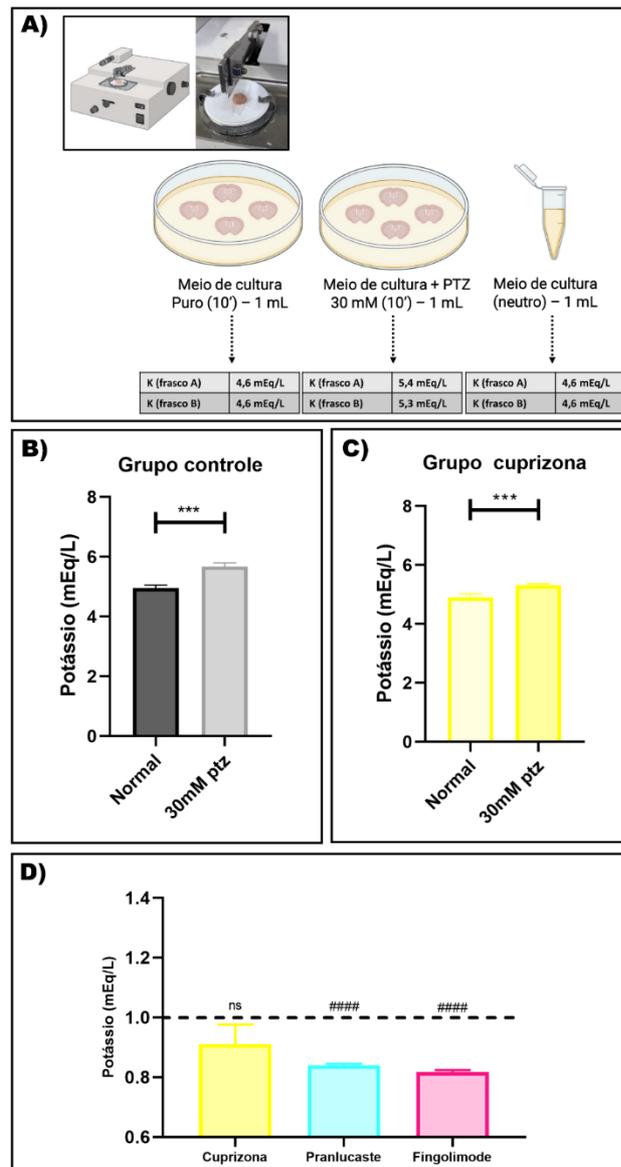


Figura 21. Dosagem de íons potássio por meio de cultura organotípica. Inicialmente verificou-se que a adição de PTZ (30 mM) no meio de cultura foi capaz de levar a um aumento significativo na concentração (mEq/L) de íons

potássio no meio extracelular dos grupos controle e CPZ (Imagem A)

Gráficos B e C. Análise estatística da variação do potássio no meio de cultura após adição de PTZ no grupo controle e CPZ. Observa-se aumento significativo da concentração de potássio após a adição de PTZ em relação ao meio de cultura normal (sem PTZ) nos grupos controle e CPZ. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média. (Controle com $n = 6$; CPZ com $n = 6$). $***p < 0.0005$ (Paired t test).

Gráfico D. Análise estatística da variação do potássio, após adição de PTZ (30 mM), no meio de cultura de todos os grupos experimentais. Observa-se redução significativa da concentração de íons potássio nos grupos pranlucaste e fingolimode em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com $n = 10$; CPZ com $n = 9$; Pranlucaste com $n = 6$; Fingolimode com $n = 6$). $####p < 0.0001$; ns = diferença não significativa (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

4.12 Dieta com 0,2% de CPZ levou à redução de canais Nav1.6 e o tratamento com fingolimode protegeu contra essa redução ao contrário do tratamento com pranlucaste

Sabe-se que os nodos de Ranvier possuem abundância de canais de sódio dependentes de voltagem Nav1.6 que são cruciais para a propagação do PA, já que sua abertura gera uma corrente iônica de Na^+ que leva à despolarização celular (KANDEL, 2013). Como a diminuição do número de canais de sódio pode causar falhas na propagação do impulso nervoso (ARANCIBIA-CARCAMO; ATTWELL, 2014), esse trabalho investigou a quantidade de Nav1.6 no corpo caloso dos grupos experimentais com intuito de correlacionar esse dado quantitativo com a probabilidade de hiperexcitabilidade cerebral.

Dessa forma, foi realizada imunofluorescência anti-Nav1.6 com intuito de analisar a quantidade de punctas e a área marcada de canais de sódio dependentes de voltagem do tipo 1.6 nos grupos experimentais. Os grupos CPZ e pranlucaste apresentaram uma diminuição significativa na quantidade de puncta em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O grupo fingolimode apresentou uma preservação de punctas Nav1.6 em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). Com relação à área marcada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 22).

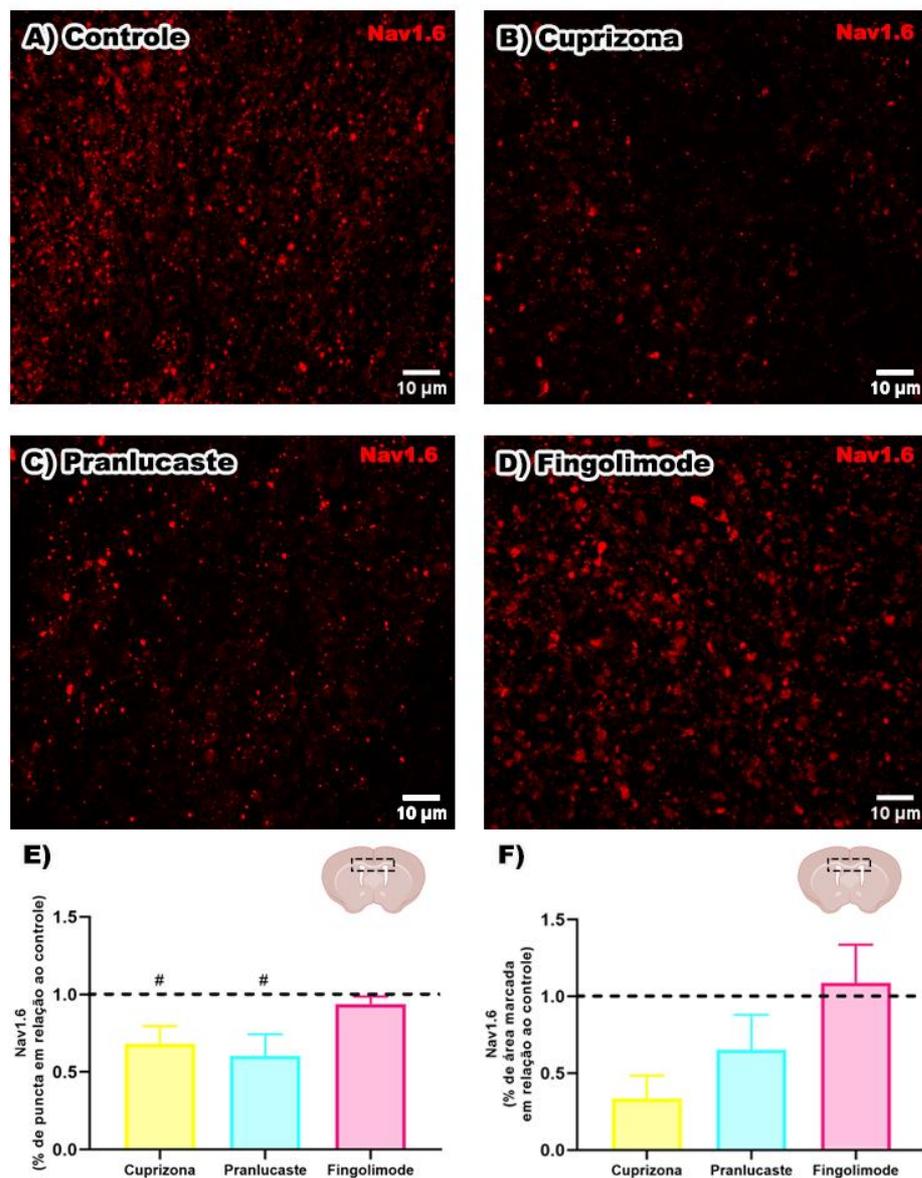


Figura 22. Imunofluorescência anti-Nav1.6. Imagens comparativas de fatias coronais do corpo caloso (A – D) quanto à quantidade de puncta marcado para Nav1.6 (vermelho). Barra de escala = 10 μ m.

Gráfico E. Análise estatística da porcentagem de puncta para Nav1.6 no corpo caloso dos grupos cuprizona, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle. Observa-se diminuição significativa na quantidade de puncta nos grupos cuprizona e pranlucaste, além de preservação da marcação no grupo fingolimode em comparação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; Cuprizona com n = 6; Pranlucaste com n = 6; Fingolimode com n = 6). $^{\#}p < 0.01$; $^{\#\#}p < 0.05$ (Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1). Teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Gráfico F. Análise estatística da porcentagem da área marcada para Nav1.6 no corpo caloso dos grupos cuprizona, pranlucaste e fingolimode em relação ao grupo controle (normalizado para 1). Observa-se ausência de diferença significativa entre os grupos. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 6; Cuprizona com n = 6; Pranlucaste com n = 6; Fingolimode com n = 6). Teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

4.13 Dieta com 0,2% de CPZ e o tratamento com pranlucaste diminuiu o peso dos baços

Sabe-se que a intoxicação com CPZ pode levar a uma atrofia de órgãos imunes periféricos, como o baço, podendo influenciar na atividade das células T (COORSSSEN et al., 2020). Além disso, sabe-se que o fingolimode previne que células T saiam de órgãos linfoides e migrem ao SNC (KIPP et al., 2012; ALME et al., 2015). Diante desses dados, analisamos o baço do grupo controle, CPZ, pranlucaste e fingolimode para melhor entender e comparar os mecanismos de ação dos tratamentos utilizados.

Vimos que os animais intoxicados com CPZ e tratados com pranlucaste apresentaram baços com um menor peso em gramas quando comparado com o grupo controle. O tratamento com fingolimode não resultou em diferenças estatísticas no peso em relação ao grupo controle (Figura 23, E). Além disso, quanto ao número de nódulos linfáticos e à razão polpa branca / área total não vimos diferença significativa entre os grupos (Figura 23, F e G).

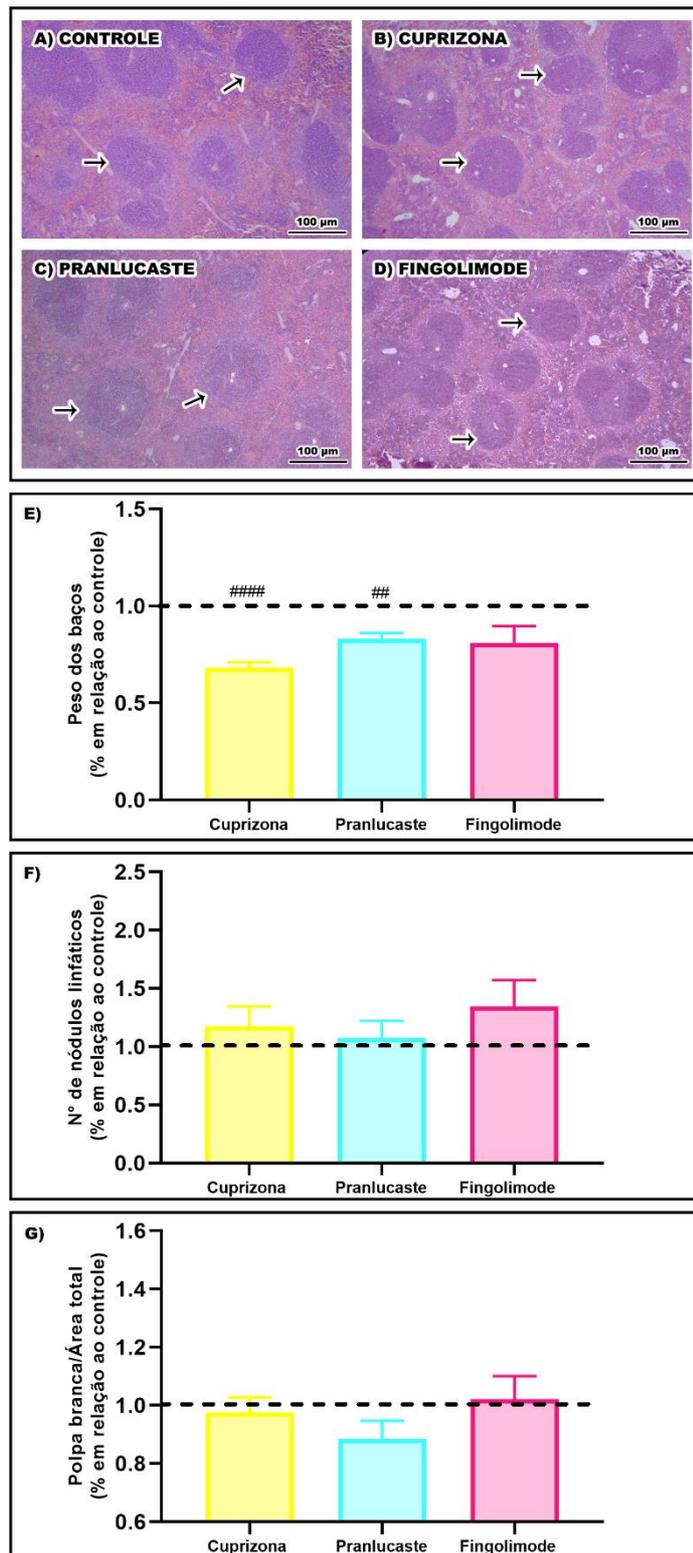


Figura 23. Análise dos baços. Cortes coronais de baços emblocados em parafina dos grupos experimentais (A, B, C e D), com nódulos linfáticos indicados pelas setas. Coloração HE. Barra de escala = 100 μ m.

Gráfico E. Análise estatística dos pesos dos baços dos grupos experimentais. Os grupos CPZ e pranlukaste apresentaram redução significativa do peso em relação ao grupo controle (normalizado para 1). O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 11; CPZ com n = 11; Pranlukaste com n = 4; Fingolimode com n = 6). ####p < 0.0001 (Teste t de uma amostra em relação ao controle

normalizado para 1). Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

Gráfico F. Análise estatística do número de nódulos linfáticos nos baços dos grupos experimentais. Não houve diferença significativa entre os grupos. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 4; CPZ com n = 4; Pranluaste com n = 4; Fingolimode com n = 6). Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1. Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

Gráfico G. Análise estatística da relação polpa branca/área total nos baços dos grupos experimentais.

Não houve diferença significativa entre os grupos. O gráfico representa a média dos experimentos e +/- o erro padrão da média (Controle com n = 4; CPZ com n = 4; Pranluaste com n = 4; Fingolimode com n = 6). Teste t de uma amostra em relação ao controle normalizado para 1. Teste One-Way Anova com pós-teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

5.1 Os tratamentos com pranluce e fingolimode mostraram efeitos protetores contra a desmielinização induzida por cuprizona, permitindo a recuperação do peso dos animais

O modelo experimental de desmielinização com a CPZ é útil para estudar a patofisiologia da desmielinização e os mecanismos de remielinização no SNC. Ele permite a avaliação de manipulações farmacológicas que podem acelerar ou inibir esses processos, com relevância potencial para tratamentos clínicos futuros (MATSUSHIMA; MORELL, 2001).

No presente trabalho foi investigado os efeitos da desmielinização em um modelo animal de EM em que os animais foram submetidos à dieta com 0,2% de CPZ. Durante as cinco semanas de intoxicação com CPZ, foi realizada uma análise da variação ponderal com intuito de acompanhar o ganho de peso dos animais ao longo do tratamento, além de permitir o cálculo das doses dos fármacos pranluce e fingolimode aplicados diariamente. Sabe-se pela literatura que o tratamento com CPZ induz a um ganho de peso mais lento em relação ao grupo controle (SEN et al., 2020), o que também foi visto em nossos animais, chegando a atingir pesos significativamente menores em relação ao controle no final do tratamento (35ª semana). Isso pode ser justificado pela desmielinização que pode ocorrer em diversas partes do sistema nervoso central (SEN et al., 2020a), incluindo o núcleo cerebelar medial que tem conexões diretas com os centros de saciedade hipotalâmicos (LI et al., 2017). Foi visto que tanto o núcleo cerebelar medial quanto os centros de saciedade hipotalâmicos mostraram desmielinização com a intoxicação por CPZ (SEN et al., 2020).

O presente estudo avaliou também como o tratamento com pranluce ou fingolimode interferiu no ganho de peso dos animais e concluiu-se que houve uma redução significativa do peso, em gramas, em relação ao grupo controle na segunda semana de tratamento. Entretanto, ao final do tratamento esses dois grupos tiveram uma recuperação significativa do peso, ficando este semelhante ao do grupo controle.

Os antagonistas do GPR17, como os antileucotrienos (pranluce e monteluce) e o cangrelor - agente antiagregante plaquetário de curta ação, estão atualmente em uso clínico e este último foi testado quanto ao seu efeito anorexígeno. Viu-se que o antagonismo do GPR17 pela injeção intracerebroventricular de cangrelor levou à redução da ingestão de alimentos

(VAN DEN BOSCH et al., 2023b). O tratamento dos nossos animais com um antagonista do GPR17, pranlucaeste, gerou uma redução de peso significativa na 2ª semana de tratamento, podendo indicar uma diminuição de apetite no início do tratamento. Entretanto há recuperação significativa do peso ao final do tratamento, diferente do que ocorreu com o grupo desmielinizado, sugerindo que o pranlucaeste possui um efeito protetor contra a intoxicação com CPZ.

Uma das reações adversas possíveis com o uso do fingolimode é a redução do peso (BLUMENFELD KAN et al., 2019; GILENYA, 2024), o que foi visto nos nossos animais na 2ª semana de tratamento com fingolimode. Nos pacientes tratados com fingolimode, as concentrações sanguíneas desse fármaco atingem seu estado de equilíbrio de 1 a 2 meses da administração de uma vez ao dia (GILENYA, 2024). No final da quinta semana de tratamento com fingolimode, nossos animais mostraram recuperação significativa do peso, sugerindo que o fingolimode também possui um efeito protetor contra a intoxicação com CPZ.

5.2 O tratamento com fingolimode demonstrou ser mais eficiente na preservação da estrutura da mielina em comparação com o pranlucaeste

O CC é uma estrutura importante na transferência e integração de informações entre os dois hemisférios cerebrais, sendo relacionado também à generalização de crises convulsivas inicialmente focais (UNTERBERGER et al., 2016). Ele é uma estrutura amplamente estudada nos modelos de EM, já que o CC é uma região altamente mielinizada no SNC e por sua desmielinização ser rapidamente induzida com a dieta com CPZ (HIBBITS et al. 2009). Acredita-se que o CC tende a sofrer desmielinização na EM por causa de sua proximidade com os tetos dos ventrículos laterais e com pequenos vasos penetrantes (KAZI et al., 2013). Assim, a região encefálica escolhida para estudo neste trabalho foi o CC.

Estudos da nossa equipe mostraram que após cinco semanas de intoxicação por CPZ, o CC é quase completamente desmielinizado (ARAÚJO et al., 2017). Nós reproduzimos esse modelo de desmielinização observando, na quinta semana de dieta com CPZ, uma redução da densidade de lipídios presentes no CC por meio da coloração com Sudan Black e Fluoromielina.

Para análise do outro componente constituinte da mielina, foi realizada imunohistoquímica contra MBP e confirmada uma redução significativa na densidade de mielina na

região do CC. Apesar da resposta de intoxicação ter sido igual na redução de ambos os componentes constituintes da mielina, os tratamentos com pranlucaste ou fingolimode não responderam igualmente. O pranlucaste foi capaz de proteger contra a perda de MBP, diferentemente do que foi observado na perda de lipídios, em que não houve melhora na densidade desse componente. Já o tratamento com fingolimode permitiu uma preservação tanto dos lipídios, quanto da densidade de MBP presentes no CC.

Como a MBP interage com os componentes lipídicos para que ocorra a compactação fisiológica da mielina (TRÄGER et al., 2020) e a desintegração da mielina pode ser explicada pelo comprometimento da ligação da MBP com a membrana com o surgimento de alterações no ambiente lipídico (MARIE-THERES WEIL, 2016), a conservação dos lipídios constituintes da mielina pelo fingolimode indica que este tratamento pode ter um efeito mais eficiente quanto à preservação da estrutura da mielina em comparação com o pranlucaste.

5.3 A intoxicação com CPZ 0,2% gerou uma diminuição no número de OLs e de fibras mielínicas, além de um aumento no número de anormalidades de mielina e na hiperexcitabilidade

A intoxicação com CPZ leva à inibição de enzimas da cadeia respiratória mitocondrial de OLs, culminando em um estresse oxidativo que gera a apoptose dessas células (WANG et al., 2013; KIPP et al., 2016). A presente tese mostrou que a intoxicação com CPZ 0,2% levou a uma redução do número de OLs maduros em camundongos suíços, o que é consistente com o mecanismo de ação desse tóxico.

Com a redução de OLs espera-se uma redução da mielina que é essencial para a condução eficiente dos impulsos nervosos, de forma que sua perda pode resultar em distúrbios de condução, podendo levar a uma maior excitabilidade neuronal e aumento da propensão a crises convulsivas (YAMAZAKI, 2019). Como a desmielinização no modelo de EM por intoxicação com CPZ é caracterizada pela crítica perda de mielina na quinta semana (MATSUSHIMA; MORELL, 2001), este trabalho realizou a contagem do número de fibras mielínicas no CC dos animais para confirmação desse dado por meio de análise da ultraestrutura que permite a visualização clara das fibras mielínicas.

Inicialmente foi analisada a distribuição das fibras no CC e não foi encontrada nenhuma

diferença significativa no número total de fibra por unidade de área, indicando uma distribuição estatisticamente homogênea das fibras em todos os grupos experimentais. Isso permite a diminuição de viés de distribuição desigual nas áreas avaliadas do corpo caloso neste estudo.

Viu-se que a intoxicação com CPZ levou a uma redução significativa no número de fibras mielínicas por unidade de área analisada, além de um aumento de anormalidades de mielina. Isso pode gerar distúrbios na excitabilidade cerebral já que pode impactar no equilíbrio de funcionamento das fibras excitatórias e inibitórias. Zoupi e colaboradores (2021) mostraram que componentes inibitórios são mais suscetíveis à neurodegeneração. Pacientes com EM progressiva secundária, apresentaram uma significativa perda axonal, redução das sinapses inibitórias e a redução seletiva de interneurônios que expressam parvalbumina e somatostatina, cujos axônios são tipicamente mielinizados (MICHEVA et al., 2016; STEDEHOUDER et al., 2017). Além disso, em modelo experimental de desmielinização focal com LPC (do inglês *Lysophosphatidylcholine*) houve redução de sinapses inibitórias sem alterações de sinapses excitatórias, indicando que lesões desmielinizantes podem causar uma neurodegeneração anatômica seletiva de componentes inibitórios (ZOUPI et al., 2021). Isso é condizente com as diferenças morfológicas entre as fibras mielínicas inibitórias e excitatórias. Sabe-se que a mielina dos neurônios inibitórios é mais espessa do que a dos neurônios excitatórios, devido às suas lamelas mais espessas. Entretanto, os neurônios inibitórios possuem um menor número de lamelas (BASU et al., 2023), de forma que quando ocorre a desmielinização, a cada lamela perdida do neurônio inibitório há uma redução mais acentuada da espessura de mielina em relação aos neurônios excitatórios.

Em experimentos com macacos adultos, viu-se que a grande maioria dos axônios no corpo caloso são mielinizados, podendo corresponder em torno de 75% do número total. Do total de axônios mielinizados, cerca de 5% correspondem a projeções axonais inibitórias e o restante (~95%) a excitatórias (BASU et al., 2023). Como os axônios mielínicos inibitórios correspondem a minoria das fibras, durante o processo de desmielinização haveria uma redução considerável no número de fibras inibitórias em relação às fibras excitatórias mielínicas.

No presente estudo houve um aumento da excitabilidade cerebral com a desmielinização, evidenciada pela maior duração do grupo CPZ em uma das fases mais graves da escala de Racine modificada, fase 6, o que sugere ser um reflexo da desmielinização proporcional e seletiva das poucas fibras inibitórias em relação às abundantes fibras excitatórias

presentes no CC.

Além do distúrbio de excitabilidade gerado pela redução do número de fibras mielínicas, a mielina danificada está diretamente relacionada a falhas na condução do impulso e na geração do PA (FRANSSEN, 2019). Durante o processo de degeneração da mielina no modelo de CPZ, inicialmente observa-se o alargamento do espaço adaxonal da bainha de mielina seguido pela vesiculação da língua interna que progride até que todas as camadas previamente compactadas sejam afetadas e a mielina seja completamente fragmentada (MARIE-THERES WEIL, 2016). Com o aumento do espaço adaxonal que foi mostrado ocorrer devido à degeneração retrógrada ("distal/dying back oligodendroglíopathy"), caracterizada pelo acometimento dos prolongamentos mais distais (periaxoniais) dos OLs (ITOYAMA et al., 1980; ABOUL-ENEIN et al., 2003), ocorre um aumento de área entre o axônio e a mielina. Como a degeneração da mielina inicia-se das lamelas mais internas, evoluindo com a fragmentação completa da mielina, o aumento inicial do espaço adaxonal pode contribuir para o vazamento e a dispersão das correntes iônicas e capacitivas, nas regiões paranodais, justaparanodais ou mesmo internodais (FRANSSEN, 2019), o que está diretamente relacionado com a distribuição de canais iônicos ao longo das fibras mielínicas (WAXMAN; RITCHIE, 1993). Essas alterações nas correntes interferem no campo elétrico e, conseqüentemente, na condução do PA ao longo da fibra (FRANSSEN, 2019), o que justificaria a relação das alterações de excitabilidade encontradas nesse trabalho com as alterações de língua interna.

Além disso, outro tipo de anormalidade de mielina no modelo de CPZ caracteriza-se pelas separações das lamelas de mielina (WEIL, 2016) que no presente trabalho foram evidenciadas pelo aumento do espaço entre as lamelas e pela presença de grandes figuras de mielina desorganizada no corpo caloso. Essas anormalidades também podem influenciar no circuito elétrico neuronal já que a presença da mielina compacta e aderida ao axônio de forma saudável é crucial para a interação adequada das cargas elétricas do meio intracelular com as do meio extracelular durante o dinamismo da despolarização e da repolarização do axônio.

Dessa forma, o aumento da excitabilidade cerebral no modelo animal de desmielinização com CPZ se relacionou à redução do número de fibras mielínicas e ao aumento de anormalidades de mielina no CC. Isso sugere, com base em dados da literatura, que esta associação se dá devido a uma menor abundância de fibras mielínicas inibitórias em relação às fibras mielínicas excitatórias no CC, podendo culminar com distúrbios no equilíbrio

inibição/excitação, além de indicar possíveis alterações no circuito elétrico e na geração/condução do PA com base nos dados sobre transmissão do impulso elétrico que depende de uma mielina íntegra e adequadamente aderida ao axônio.

5.4 O tratamento com fingolimode protegeu parcialmente contra a perda de fibras mielínicas, além de ter impedido o aumento de anormalidades de mielina e a hiperexcitabilidade cerebral

Têm sido sugeridos múltiplos modos de ação do fingolimode em nível celular, principalmente devido ao fato de que o receptor S1P é expresso por vários tipos celulares do SNC, dentre eles microglia, neurônios, ASs, células endoteliais e OLs (BORDET et al., 2020). Geralmente, a ligação da S1P3 e S1P5 aos seus respectivos receptores leva à ativação via proteína G12/13, culminando em retração da membrana de OLs via RhoA GTPase, enquanto a ligação S1P1 ao seu receptor leva à ativação via proteína Gi/o associada à ativação da GTPase Rac1 e Ras e subsequente sobrevivência e extensão da membrana de OLs. Estudo mostrando a interferência de diferentes doses de fingolimode aplicadas em cultura de OLs evidenciou que respostas dose-dependentes podem refletir diferentes afinidades pelos receptores S1P. Doses mais baixas de fingolimode fosforilado podem ser mais propensas a se ligar a receptores S1P1 de maior afinidade para induzir a extensão dos prolongamentos de OLs, enquanto que receptores S1P3/S1P5 de menor afinidade, necessitam de doses mais altas para serem ativados e desencadearem a retração dos prolongamentos de OLs (MIRON et al., 2008). Logo, a terapia com fingolimode pode afetar eventos celulares implicados na manutenção da mielina.

Diferente do trabalho citado anteriormente, os experimentos do presente estudo ocorreram *in vivo*, sendo difícil a comparação das doses de fingolimode utilizadas *in vitro* na busca de uma equivalência. No entanto, o tratamento dos animais na dose de 1 mg/kg não levou ao aumento no número de OLs maduros, ou seja, não foi capaz de interferir na apoptose dessas células induzida pela CPZ, mas foi possível observar um aumento da mielina e do número de fibras mielínicas, permitindo inferir que o fingolimode possa ser capaz de estimular maior mielinização a partir de OLs pré-existentes à lesão, provavelmente por meio da extensão de seus prolongamentos, o que gera um efeito protetor contra a hiperexcitabilidade cerebral diretamente associado à mielina em um modelo animal de EM.

A remielinização está diretamente associada à diferenciação das OPCs em OLs com

fenótipo mielinizante. No entanto, a modulação da mielina também pode ser assumida pelos OLs sobreviventes às lesões (YEUNG, M. S., et al., 2014; DUNCAN, I. D., et al., 2018; BACMEISTER, C. M., et al., 2020). Yeung e colaboradores (2019), avaliaram a dinâmica de geração de OLs em pacientes com EM medindo a integração de carbono 14 no DNA genômico derivado do teste de bomba nuclear. A geração de novos OLs aumentou várias vezes na substância branca de aparência normal em um subgrupo de indivíduos com doença muito agressiva, porém isso não ocorreu na maioria dos indivíduos com EM, demonstrando um potencial inerente de aumentar substancialmente a geração de OLs, mas que falha na maioria dos pacientes. Observou-se ainda que OLs em “Shadow plaques” – lesões focais em pacientes com EM nas quais houve uma diminuição da inflamação e em que há menor densidade de mielina do que a substância branca aparentemente normal, podendo representar áreas remielinizadas - eram antigos em pacientes com EM. A ausência de novos OLs nas “Shadow plaques” sugere que a remielinização das lesões ocorre transitoriamente ou não ocorre, ou que a mielina é regenerada por OLs pré-existentes, e não pelos recém-gerados, na EM. (YEUNG, M. S. Y., et al., 2019). Assim, o atual trabalho sugere que os OLs pré-existentes à lesão nos animais submetidos ao tratamento com fingolimode contribuíram para a proteção contra a desmielinização.

Foi demonstrado que a intoxicação por CPZ quando interrompida precocemente desencadeia uma cascata de eventos que leva à desmielinização em duas a três semanas sem a necessidade de exposição adicional do tóxico, indicando que o insulto inicial à mielina causado pela CPZ não é revertido (DOAN et al., 2013). Como a CPZ leva à apoptose dos OLs, a bainha de mielina pode ser preservada por algum tempo antes da fragmentação (MARIE-THERES WEIL, 2016). Assim, outra explicação para um maior número de fibras mielínicas encontradas nos animais tratados com fingolimode seria a capacidade desse fármaco de reverter o insulto inicial aplicado aos OLs, impedindo o aumento estatisticamente significativo de formação de anormalidades e, conseqüentemente, a degeneração da mielina.

Experimentos mostraram que o fingolimode exerce efeitos antiepilépticos modificadores de doença com base em suas propriedades anti-neuroinflamatórias (ex: reduz a atividade de NF- κ B e a expressão de TNF- α e COX-2), potente neuroproteção, efeitos antiglióticos, proteção da mielina, redução da via de sinalização mTOR e ativação da micróglia e astrócitos (GAO et al., 2018; PAUDEL et al., 2020; HU et al., 2021). Gol e colaboradores (2017) mostraram que o tratamento com fingolimode na mesma dose utilizada em nosso

trabalho (1 mg/Kg) aumentou os níveis de mielina, reduziu a frequência de convulsões e descargas epileptiformes em modelo de convulsões induzidas por PTZ (GOL et al., 2017). Em outro modelo experimental de epilepsia do lobo temporal com a utilização de pilocarpina e ácido caínico viu-se que o fingolimode reduziu a severidade e frequência das convulsões. (PITSCH et al., 2019)

Apesar dessas evidências mostrarem um potencial uso do fingolimode como um fármaco antiepiléptico, a atual tese mostrou pela primeira vez os efeitos do fingolimode quanto à proteção contra a hiperexcitabilidade em um modelo animal de EM com utilização de CPZ, podendo ampliar sua indicação de uso em pacientes com EM que desenvolverem convulsões com a progressão da doença.

Este trabalho evidenciou uma melhora da gravidade das convulsões com o tratamento com fingolimode por cinco semanas, quando observamos que houve uma redução do tempo de duração na fase 6, uma das fases mais graves da escala de Racine modificada, reafirmando a atividade anticonvulsivante desse fármaco. Entretanto, nosso trabalho envolveu um modelo de desmielinização, diferente de Pitsch e colaboradores (2019) que utilizaram um modelo puramente epiléptico, indicando que a redução da hiperexcitabilidade cerebral promovida pelo fingolimode em nosso trabalho se relaciona com a preservação da mielina.

Sabe-se que existem interações muito específicas entre OLs e neurônios, sendo a mielinização direcionada de forma distinta entre os neurônios inibitórios e excitatórios, apesar de ainda não ser claro o porquê de a mielinização ocorrer de forma diferente entre os tipos de neurônios (ZONOUZI et al., 2019). Estudos complementares serão necessários para esclarecer se a melhora da excitabilidade com o fingolimode se deve à preservação de OLs que tem como principal alvo axônios de neurônios inibitórios, reforçando a justificativa da proteção contra a hiperexcitabilidade em um modelo de desmielinização por CPZ, mostrada pela primeira vez neste trabalho.

Dessa forma, o tratamento com fingolimode foi capaz de proteger de forma significativa contra a perda das fibras mielínicas e contra o aumento estatisticamente significativo de anormalidades de mielina, além de proteger contra a excitabilidade cerebral. Isso sugere, com base em dados da literatura, que o fingolimode induziu um aumento da mielinização por meio de OLs pré-existentes à lesão ou retardou a fragmentação da mielina. Com a preservação desta

há, conseqüentemente, proteção do circuito elétrico, garantindo a geração e transmissão do impulso elétrico de forma eficiente. Investigações complementares são necessárias para maior entendimento sobre o modo de ação do fingolimode na preservação da estrutura da fibra mielínica, garantindo, por exemplo, a estabilização ou aumento da expressão de proteínas importantes para a adesão da mielina e de canais iônicos, assim como a proteção contra a hiperexcitabilidade.

5.5 O tratamento com pranlucaeste não impediu a perda de fibras mielínicas, mas protegeu contra o aumento de anormalidades de mielina e contra a hiperexcitabilidade cerebral

A inibição do GPR17 pelo pranlucaeste pode levar ao aumento da sobrevivência de OLs devido à redução de Xaf1, supressor tumoral que leva vários tipos celulares à apoptose (OU et al., 2016). Entretanto, essa inibição não foi suficiente para proteger os OLs da toxicidade da CPZ, já que o tratamento com pranlucaeste não foi capaz de gerar um aumento no número dessas células, justificando uma quantidade de fibras mielínicas semelhante ao do grupo tratado com CPZ.

A EM é uma doença autoimune marcada pela perda de fibras mielínicas e caracterizada por uma robusta neuroinflamação (COMPSTON et al., 2008; DI FILIPPO et al., 2015; YONG et al., 2017), sendo que esta pode estar relacionada aos mecanismos de geração de hiperexcitabilidade. A inflamação tem um papel crucial na fisiopatologia das convulsões (VEZZANI, 2005). Por exemplo, antagonistas do receptor da interleucina (IL)-1 β levou à redução das crises convulsivas em modelos experimentais (BALOSSO et al., 2008). A IL-1 β parece estar associada ao prolongamento de crises convulsivas pelo aumento da neurotransmissão glutamatérgica (VEZZANI et al., 1999). Além disso, camundongos que expressavam altos níveis de interleucina-6 (IL-6) apresentavam precipitação de convulsões (CAMPBELL et al., 1993). A superexpressão de IL-6 levou à perda de neurônios positivos para parvalbumina, proteína abundante em interneurônios inibitórios, no hipocampo podendo representar um aumento de atividade excitatória (CAMPBELL et al., 1993).

Diante da associação entre inflamação e convulsões, estudos foram feitos com antagonistas de receptores CysLT, como pranlucaeste e montelucaste, mostrando que esses fármacos foram capazes de diminuir as convulsões induzidas por PTZ (LENZ et al., 2014), entretanto, no presente trabalho a escolha do pranlucaeste se deveu à sua superioridade de

inibição do GPR17 quando comparado ao montelukaste (HENNEN et al., 2013). Um estudo sobre terapia complementar com pranlucaste em pacientes com epilepsia parcialmente intratável mostrou uma redução da frequência das crises convulsivas, provalmente pelo seu mecanismo anti-inflamatório envolvendo a redução de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β , IL-6 e TNF α) no líquido dos pacientes (TAKAHASHI et al., 2013). Ichiyama e colaboradores (2003) mostraram que o pranlucaste, em doses micromolares, suprimiu a produção de citocinas pró-inflamatórias via inibição da ativação do NF-kappa B em monócitos/macrófagos e células T.

Sabe-se que as fibras mielínicas são cruciais para a transmissão do impulso elétrico (FRANSSEN, 2019), entretanto no presente estudo não houve um aumento no número dessas fibras nos animais tratados com pranlucaste, diferente do ocorrido nos tratados com fingolimode. Entretanto, ambos os tratamentos foram capazes de proteger contra a excitabilidade visto que estes animais permaneceram menos tempo na fase 6 da escala de Racine modificada. Isso sugere mecanismos distintos de proteção contra a hiperexcitabilidade entre esses dois fármacos. Diante da forte correlação entre inflamação e convulsões (VEZZANI, 2005), a redução da hiperexcitabilidade nos animais tratados com pranlucaste neste presente estudo possivelmente se deve ao forte potencial desse fármaco em interferir na redução da inflamação. Entretanto, o foco deste trabalho não se deu nos mecanismos inflamatórios subjacentes às condições analisadas.

Apesar da não preservação das fibras mielínicas no CC com o pranlucaste neste trabalho, sabe-se que, na substância aparentemente normal de pacientes com EM, essas fibras apresentaram uma redução na densidade de mielina que sugere descompactação, interferindo na funcionalidade que foi avaliada por meio da razão-g (VAN DEN BOSCH et al., 2023a). Essa redução da densidade de mielina apresentou correlação negativa com células inflamatórias (microglia e linfócitos) de forma que quanto menor era a densidade de mielina maior era a presença de células inflamatórias (VAN DEN BOSCH et al., 2023a). Isso mostra uma correlação da inflamação com a descompactação da mielina, o que pode gerar interferências no campo elétrico e na condução do PA ao longo da fibra. Como o tratamento com pranlucaste no presente estudo gerou a preservação parcial de MBP, que possui um papel crítico na compactação da mielina (TRÄGER et al., 2020), isso pode implicar em uma melhor estabilidade da compactação em regiões encefálicas caracterizadas inicialmente pela diminuição da densidade de mielina ou mesmo das fibras mielínicas sem alterações aparentes

na ultraestrutura do CC desses animais. Atrélado ao ambiente anti-inflamatório gerado pelo pranlucaste, isso poderia justificar a ausência de quantidade significativamente maior de anormalidades de mielina encontradas no pranlucaste, o que pode contribuir para a proteção contra a hiperexcitabilidade nos animais que receberam este fármaco.

Diante da importância do equilíbrio do sistema neural como um todo, outros estudos são necessários para analisar não só a região desmielinizada, mas também as regiões aparentemente normais para complementação da avaliação dos efeitos do pranlucaste na bainha de mielina que podem estar contribuindo para melhorar a excitabilidade por meio da preservação da compactação da mielina, visto que a melhora neste trabalho não se relacionou à preservação do número de fibras mielínicas.

Observa-se então que o tratamento com pranlucaste não protegeu contra a perda de OLs no modelo de CPZ e, diferente do que ocorreu com o fingolimode, não houve aumento do número de fibras mielínicas. Isso indica que a proteção contra a hiperexcitabilidade cerebral pode ter ocorrido por um mecanismo diferente ao associado à proteção da mielinização, por exemplo por meio de efeitos anti-inflamatórios. Entretanto, o pranlucaste parece interferir na estrutura da mielina por meio da preservação de proteínas responsáveis pela compactação, como MBP, impedindo o aumento estatisticamente significativo de anormalidades de mielina e, consequentemente, contribuindo para a funcionalidade adequada do circuito elétrico neural.

5.6 A dieta com CPZ 0,2% levou a um aumento significativo de OPCs, o que não foi visto nos tratamentos com fingolimode ou pranlucaste

As OPCs adultas são responsáveis por gerar novos OLs para restauração da bainha de mielina em situações desmielinizantes (ZAWADZKA et al., 2010). Essas células são capazes de migrar para os locais de lesão com o intuito de remielinizar. Inicialmente as OPCs próximas às áreas de lesão passam por um processo de ativação que consiste na mudança de morfologia e o perfil de expressão gênica (MOYON et al., 2015). Em seguida, elas são recrutadas para área desmielinizada por meio de proliferação e possivelmente migração para finalmente se diferenciarem em OLs formadores de mielina madura (FRANKLIN, 2002). Acredita-se que moléculas sinalizadoras (fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, neurotransmissores e matriz extracelular) estejam envolvidas no recrutamento de OPCs (FRANKLIN, 2002). Moyon e colaboradores (2015) mostraram que as próprias OPCs contribuíram para o meio inflamatório

após a lesão com o aumento, por exemplo, de Ccl2 e Il1 β que são secretadas por células inflamatórias e atuam como moléculas sinalizadoras para atração celular (MOYON et al., 2015). No presente trabalho, o grupo lesão mostrou um maior recrutamento de OPCs no corpo caloso o que pode ter ocorrido pela presença de moléculas sinalizadoras após a ocorrência da desmielinização.

A disfunção mitocondrial, relacionada à intoxicação por CPZ ou à fisiopatologia da EM se associa ao metabolismo de oxigênio para produção de energia, sendo que esse processo leva à produção de ROS prejudiciais que podem atacar biomoléculas, colocando em risco células neurais que são altamente sensíveis e vulneráveis aos danos causados pelos efeitos adversos das ROS. Como as OPCs possuem limitados mecanismos de defesa antioxidante elas são as principais a sofrerem com a liberação das ROS. Assim, sua maturação em OLs fica prejudicada, assim como a remielinização (LÓPEZ-MUGURUZA; MATUTE, 2023). Isso pode justificar a menor eficiência da remielinização em doenças crônicas desmielinizantes, como a EM, que gera axônios desnudos que ficam mais suscetíveis à degeneração, culminando em sintomas irreversíveis nos pacientes (FERGUSON, 1997; NOSEWORTHY et al., 2000). A não ocorrência de aumento simultâneo do número de OLs pode ser justificado pelo prejuízo na maturação de OPCs ou mesmo pela maior velocidade de apoptose de OLs pela CPZ em relação à velocidade de maturação dos progenitores. O tratamento com fingolimode ou pranlucaste não induziu o aumento de OPCs. No caso do fingolimode a preservação da mielina - que sugere uma menor extensão de áreas desmielinizadas, e um menor ambiente inflamatório (HOFFMANN et al., 2015) podem ter levado a um menor recrutamento de OPCs. Já no caso do tratamento com pranlucaste, a redução do ambiente inflamatório (ICHIYAMA et al., 2003), e não a preservação da mielina, pode ser a justificativa para uma menor quantidade de OPCs encontradas no corpo caloso dos animais. O pranlucaste atua através do antagonismo do GPR17 permitindo a maturação de OPCs (THERON et al., 2014), assim a menor quantidade de OPCs também poderia estar sendo justificada pelo aumento da maturação em OLs. Entretanto, esse aumento de OLs maduros não foi visualizado no grupo tratado com pranlucaste, mostrando que esse tratamento não protegeu essas células da apoptose induzida pela dieta com CPZ. Para melhor esclarecimento dessa dinâmica celular que se relaciona ao processo de mielinização e remielinização, mais experimentos se mostram necessários.

Como em situações saudáveis é possível observar a persistência de OPCs ao longo da vida após padrões de mielinização madura terem sido estabelecidos, sugere-se que OPCs podem

ter papéis importantes além da geração de novos OLs com fenótipos mielinizantes. Auguste e colaboradores (2022) mostraram que um desses papéis envolve a remodelação sináptica, em que as OPCs são capazes de fagocitar e digerir sinapses no sistema visual de camundongos em desenvolvimento. Já os OLs maduros não continham material sináptico, sugerindo que a internalização das entradas sinápticas é uma função dos OPCs que não se estende a outras células da linhagem oligodendroglial (AUGUSTE et al., 2022b). Assim, as OPCs não só respondem a, mas também são capazes de modular a rede neuronal. A eletrofisiologia de neurônios piramidais do córtex somatossensorial de camundongos sem a proteína NG2 mostrou um comprometimento da potenciação de longo prazo (LTP) dependente do NMDAR e redução das correntes do receptor de glutamato nessas sinapses neuronais. Além disso, observou-se que a inibição da ADAM10, protease que cliva o NG2 em condições fisiológicas, em camundongos controle mimetiza o fenótipo NG2^{-/-}, refletido por uma redução na LTP NMDAR-dependente. (SAKRY D., et al., 2014). Como a redução de NG2 mostrou-se associada ao comprometimento de elementos excitatórios como LTP NMDAR-dependente e o glutamato, a maior presença de OPCs no grupo CPZ pode estar associada ao aumento da hiperexcitabilidade, enquanto a menor presença de OPCs nos grupos tratados com fingolimode ou pranlucaste pode estar associada à proteção contra a hiperexcitabilidade.

5.7 O tratamento com fingolimode preservou um maior número de fibras com a razão-g na faixa ideal, mas ambos os tratamentos protegeram parcialmente contra a diminuição da sensibilidade tátil

A razão-g, definida como a proporção entre o diâmetro do axônio e o diâmetro total da fibra nervosa, é um indicador da funcionalidade das fibras mielínicas. Para seu cálculo, analisou-se a área do axônio, área da mielina e a área da fibra (Figura 15, gráficos B, C e D). A média da área de mielina no controle e cuprizona não teve diferença significativa, o que pode indicar que as fibras mielínicas desses dois grupos possuem a mesma espessura devido à desmielinização total das fibras no grupo cuprizona. Já no grupo pranlucaste, observou-se uma redução da média da área de mielina em relação ao controle, o que pode sugerir uma possível resistência contra a desmielinização abrupta. Esse efeito do tratamento com o pranlucaste pode ser explicado pela menor quantidade de lipídios preservados, mas manutenção da compactação pela preservação de MBP (Figura 11). Já no grupo fingolimode a média da área de mielina não teve diferença significativa em relação ao controle, indicando que as fibras desses dois grupos possuem a mesma espessura, possivelmente pela proteção contra a desmielinização mostrada

pelo fingolimode.

O valor de 0,77 foi definido como uma razão-g ideal para o sistema nervoso central, sendo a faixa de 0,75 – 0,81 mostrada como ideal em corpo caloso de ratos (CHOMIAK; HU, 2009). Viu-se que alterações discretas na razão-g na faixa de 0,6 a 0,8 podem resultar em mudanças substanciais na velocidade de condução do impulso elétrico (SMITH; KOLES, 1970). Dessa forma, neste trabalho, a razão-g foi calculada e as fibras foram organizadas em diferentes faixas.

A literatura mostra uma variação de valores ótimos de razão-g de acordo com a espécie e a região analisada (CHOMIAK; HU, 2009), entretanto, em uma mesma região analisada observa-se uma variação de razão-g ideal nos animais saudáveis em diferentes trabalhos. Xiu e colaboradores (2017) mostraram que a média da razão-g ideal das fibras mielínicas no CC dos camundongos controle foi de 0,76 (XIU et al., 2017), enquanto Qin e colaboradores (2017) mostraram que a média da razão-g ideal de fibras mielínicas do CC dos camundongos controle ficou entre o intervalo de 0,8 – 0,9 (QIN et al., 2017). O presente estudo mostrou que a faixa de 0,69 – 0,74 continha a maioria das fibras mielínicas em relação aos outros intervalos analisados. Essa variação na literatura pode se dar devido à grande complexidade de organização das fibras nervosas no CC (LAMANTIA; RAKIC, 1990).

Xiu e colaboradores (2017) mostraram que a média da razão-g das fibras mielínicas no CC dos camundongos expostos à CPZ foi reduzido para 0,69 e sabe-se que a redução dos valores de razão-g no corpo caloso pode indicar um prejuízo na conectividade, levando à integração funcional anormal entre as diferentes regiões encefálicas (XIU et al., 2017). A média da razão-g entre os grupos do presente trabalho não apresentou diferença significativa, entretanto é importante observar que somente as fibras que permaneceram mielinizadas e sem anormalidades de mielina foram utilizadas para o cálculo da razão-g. Dessa forma, esta pode não ser o melhor índice para análise de recuperação funcional.

Apesar da média da razão-g não ter mostrado diferença significativa, nos animais desmielinizados deste trabalho, observou-se uma diminuição no número de fibras mielínicas com razão-g entre 0,75 – 0,81 em comparação com o grupo controle, indicando um possível comprometimento na funcionalidade dessas fibras. Nos animais tratados com fingolimode, a razão-g apresentou valores semelhantes ao do controle, sugerindo uma recuperação da

funcionalidade dessas fibras mielínicas. Esse efeito pode ser atribuído à capacidade do fingolimode de proteger contra a desmielinização e preservar a estrutura normal da mielina, já que a razão-g dentro da faixa ideal é usada como um indicador de mielinização ótima (OSORIO-QUEREJETA et al., 2017).

Diferente do fingolimode, o tratamento com pranlucaste não contribuiu para a normalização da razão-g na faixa de 0,75 – 0,81, entretanto observou-se uma melhora na excitabilidade por meio dos experimentos de indução de convulsão com PTZ e uma melhora da função sensitiva, o que pode ser justificado por outros motivos, por exemplo sua ação anti-inflamatória atuando na melhora da função sensitiva e na hiperexcitabilidade cerebral, conforme discutido anteriormente.

Pacientes com EM podem apresentar uma variedade de sintomas clínicos que se relacionam com a área de lesão no sistema nervoso, podendo incluir disfunções motoras, dor, complicações cognitivas, depressão, distúrbios visuais, fadiga, distúrbios do sono, ansiedade, convulsões, entre outros. Há uma prevalência significativa de dor e parestesia nos pacientes (SEN et al., 2020b; SEN et al., 2019). Já foi demonstrado na literatura que o modelo animal de desmielinização por intoxicação com CPZ gerou mudanças nas funções sensoriais (VAKILZADEH et al., 2016; BÖLCSKEI et al., 2018; TSUKAHARA et al., 2018) e que a piora funcional significativa começa a ocorrer a partir de 14 dias de intoxicação (SEN et al., 2020b).

Dessa forma, neste trabalho confirmou-se que a alimentação com CPZ causa déficit sensitivo no período de pico da desmielinização (quinta semana de tratamento) por meio do teste sensitivo com o analgesímetro digital. Nos animais tratados com fingolimode, houve uma melhora parcial significativa na sensibilidade tátil, o que pode ser explicado pela proteção contra a desmielinização e pela preservação da condução nervosa. Essa recuperação parcial da sensibilidade tátil é um indicativo da eficácia do tratamento na reversão dos déficits sensoriais associados à desmielinização.

O tratamento com pranlucaste, apesar da não normalização da razão-g na faixa considerada como ideal, também mostrou benefícios na recuperação da sensibilidade tátil, o que pode estar relacionado à redução da inflamação promovida por este fármaco (ICHIYAMA et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2013), contribuindo para um ambiente mais favorável à

reparação neuronal e à recuperação das funções sensoriais. Sabe-se que a inflamação crônica pode exacerbar a desmielinização e, conseqüentemente, a perda sensitiva, e a mitigação dessa inflamação pode ser benéfica para a recuperação funcional (OSORIO-QUEREJETA et al., 2017).

Dessa forma, o tratamento com fingolimode ou pranlucaste resultou em uma melhora na sensibilidade tátil dos camundongos, sugerindo uma abordagem terapêutica, com mecanismos de ação distintos, potencialmente eficaz para a recuperação dos déficits sensoriais em condições de desmielinização, o que é crucial para a qualidade de vida dos pacientes portadores de EM.

5.8 O tratamento com pranlucaste ou fingolimode diminuiu a concentração de íons K^+ extracelular, mas teve efeitos distintos nos segmentos excitáveis de axônio

Além da expressão de mediadores inflamatórios observados em doenças como a EM e a epilepsia (HEALY et al., 2022; SOLTANI KHABOUSHAN, YAZDANPANA, REZAEI, 2022), a glia também pode se relacionar com distúrbios de excitabilidade de outras formas, como pela homeostase de íons K^+ (DE CURTIS; GARBELLI; UVA, 2021).

Sabe-se que expor o SNC a uma alta concentração de K^+ pode induzir descargas epileptiformes e que o excesso de K^+ é liberado dos neurônios durante as convulsões (SOMJEN, 2002). Viu-se que os níveis de K^+ extracelular acima de 10 mM eram capazes de aumentar as chamadas correntes persistentes (inativação lenta) de Na^+ , elevando a ameaça de graves conseqüências patológicas (SOMJEN; MÜLLER, 2000). Essas correntes de sódio persistentes são críticas para geração de disparos repetitivos em face da entrada sináptica despolarizante ((ZHANG et al., 2015) e evidências mostraram a persistência da corrente de sódio conduzida por Nav como um contribuinte para a patogênese da epilepsia (ANDERSON et al., 2014). Tanto o Nav1.6 quanto o Nav1.2 são expressos ao longo de axônios desmielinizados na substância branca de camundongos em modelo de EAE e na substância branca humana de placas de EM (RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005) e contribuem para a corrente persistente de sódio (ZHANG et al., 2015), embora sugira-se que o Nav1.2 produza uma corrente persistente menor do que Nav1.6 (RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005). Entretanto observou-se que há uma expressão mais robusta de Nav1.2 em axônios desmielinizados que é capaz de disparar potenciais de ação a partir de potenciais de membrana mais despolarizados do que o normal

(RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005). Dessa forma, com o dano da mielina e o aumento da concentração externa de íons K^+ há a despolarização neuronal e a expressão mais acentuada de Nav1.2 poderia ajudar a manter o disparo do PA em tal situação (RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005).

Para verificar se a associação do aumento do potássio extracelular com o aumento da excitabilidade estava presente em nosso modelo experimental e se os tratamentos realizados eram capazes de proteger contra a probabilidade de convulsões nos animais via redução de potássio extracelular, realizamos a quantificação da dosagem desse íon por meio de cultura organotípica de fatias encefálicas. O presente trabalho mostrou que a adição de PTZ no meio de cultura foi capaz de causar mudanças significativas na concentração de íons K^+ no volume analisado. Entretanto, quando os grupos foram comparados entre si, o CPZ não mostrou aumento na concentração de K^+ no meio de cultura, em relação ao controle, quando adicionado PTZ. Como o volume do espaço extracelular representa cerca de um quinto e o espaço intracelular representa o restante do volume total (VAN HARREVELD, CROWELL e MALHOTRA, 1965) as estimativas das mudanças iônicas extracelulares podem ser distorcidas. Isso é especialmente relevante em experimentos *in vitro*, nos quais as alterações iônicas extracelulares podem ser atenuadas pelos grandes volumes utilizados nos ensaios (RAIMONDO et al., 2015). Além disso, a sinalização eletroquímica no SN depende do potencial de membrana e do potencial de reversão dos íons, sendo este último relacionado ao gradiente de concentração transmembranar (RAIMONDO et al., 2015) que não foi analisado neste trabalho. Assim, a mudança na concentração de K^+ pode ter sido significativa na interface da membrana do neurônio no grupo CPZ. A relação entre a dinâmica de K^+ e a atividade neural é complexa e entender o papel preciso do K^+ na geração de convulsões exigirá combinar esse trabalho com outros meios para medir experimentalmente as mudanças na concentração de K^+ na região da interface da membrana, por exemplo, com a utilização de eletrodos sensíveis a K^+ .

Quanto à variação de K^+ nos tratamentos com pranluaste ou fingolimode evidenciou-se que ambos os fármacos foram capazes de reduzir o potássio extracelular, o que se correlacionou nesse presente estudo com uma menor probabilidade de convulsões mediadas por PTZ.

Sabe-se que os canais de Kir contribuem para o controle espacial da concentração de K^+ (PAPANIKOLAOU; LEWIS; BUTT, 2019; KINBOSHI; IKEDA; OHNO, 2020), assim,

situações que aumentem a expressão desses canais podem levar a benefícios na homeostase de íons K^+ . Um exemplo disso foi visto na presença de IL-6 que gerou diminuição de mRNA e proteínas de canal Kir4.1 em experimentos realizados em ratos (LU et al., 2022). Como em estudo ainda não publicado por nossa equipe (ANA BEATRIZ MIRANDA DE SÁ, 2024) mostrou-se um aumento significativo na astrogliose por WB a partir de amostras de córtex visual em animais do grupo CPZ e do grupo pranlucaste, além de diminuição da densidade de IL-6 no córtex visual de animais tratados com pranlucaste, sugere-se uma redução da concentração de K^+ extracelular pelo tratamento com pranlucaste atrelada à sua capacidade de reduzir mediadores inflamatórios como a IL-6, contribuindo para um melhor *clearance* desse íon.

O efeito da redução de K^+ observada no tratamento com fingolimode também pode estar associada à sua interferência nas células da glia, já que os receptores S1P são expressos por praticamente todas as linhagens de células neurais no SNC, incluindo OLs, neurônios, astrócitos e microglia (CHUN; HARTUNG, 2010). Evidências apontam para a influência da S1P na proliferação, migração e astrogliose de astrócitos (CHUN; HARTUNG, 2010), o que pode contribuir para uma maior captação do excesso de potássio do meio extracelular pelo tratamento com fingolimode.

Assim, a redução da concentração de íons K^+ extracelular, aumentada em situações de desmielinização, por fármacos como pranlucaste e fingolimode capazes de interferir no *clearance* iônico pode estabelecer novas opções de tratamento por um mecanismo não sináptico de controle da hiperexcitabilidade. No entanto, ainda precisa ser mais bem esclarecido se essa redução é devida a maior captação de potássio por células da glia.

Além da análise da concentração de potássio no meio extracelular, este trabalho investigou o papel do fingolimode e pranlucaste na preservação da estrutura dos segmentos excitáveis de axônio que é crucial para a adequada transmissão ou geração do PA (ISHIBASHI e BABA, 2022).

Durante o desenvolvimento, inicialmente ocorre expressão dos canais Nav1.2 que se agrupam nos nodos imaturos de Ranvier. À medida que a mielinização progride ocorre expressão de Nav1.6 que substitui os canais Nav1.2 nos nodos de Ranvier (BOIKO et al., 2001). Essa expressão direcionada é importante já que esses canais possuem propriedades funcionais

distintas que podem afetar o comportamento neuronal (RUSH; DIB-HAJJ; WAXMAN, 2005).

Entretanto, em situações patológicas há expressão desses dois subtipos de canais em axônios desmielinizados, com uma diminuição da expressão de Nav1.6 e um aumento da expressão de Nav1.2, sugerindo que a eletrogênese nessas situações pode reverter para um estágio semelhante ao de células imaturas, em que os canais Nav1.2 suportam a condução de potenciais de ação ao longo dos axônios (CRANER, 2003). Sendo assim, a menor quantidade de canais Nav1.6 encontrados no grupo CPZ, que possui redução na quantidade de fibras mielínicas, pode sugerir uma perda da característica de segmentos excitáveis de axônios maduros.

O tratamento do pranlucaste não se associou à normalização da quantidade de Nav1.6 e como não houve melhora do quantitativo de fibras mielínicas neste tratamento, sugere-se que a redução desses canais se deve à menor presença de fibras mielínicas e que o pranlucaste não parece induzir um aumento da expressão de canais Nav1.6 em situações de desmielinização.

A velocidade de condução do impulso nervoso depende de três principais fatores: diâmetro do axônio, isolamento elétrico com a mielina (largura da mielina e comprimento do internodo) e densidade de canais iônicos (principalmente canais Nav e Kv) (RAMA; ZBILI; DEBANNE, 2018). Assim, diante da preservação da estrutura de nodos de Ranvier maduros com canais Nav1.6 sugere-se que o tratamento com fingolimode levou à preservação da velocidade de condução do impulso elétrico em níveis fisiológicos, contribuindo para a proteção contra a hiperexcitabilidade. Qin e colaboradores (2017) mostraram que, em situações de lesões isquêmica na substância branca, o tratamento com fingolimode foi capaz de reverter significativamente os danos estruturais nos nodos de Ranvier promovendo uma redução do comprimento de marcação de Nav1.6 (QIN et al., 2017), reforçando a capacidade desse fármaco de proteger os segmentos excitáveis de axônios.

5.9 A dieta com CPZ 0,2% reduziu o peso dos baços, assim como o tratamento com pranlucaste

Evidências mostram que a CPZ é capaz de gerar atrofia do timo e do baço, o que pode estar associado à falha desse modelo em desencadear uma resposta imune adaptativa no SNC mediada por células T, além da não ruptura da BBB (MESSORI et al., 2007; SOLTI et al.,

2015; PARTRIDGE et al., 2016; SEN et al., 2019a; ALMUSLEHI et al., 2020). De acordo com a literatura, os resultados obtidos revelaram que os animais intoxicados com CPZ apresentaram baços significativamente menos pesados em comparação ao grupo controle. Dessa forma, além dos efeitos da CPZ no SNC simulando a desmielinização que ocorre na EM, ela também apresenta toxicidade sistêmica que pode afetar órgãos periféricos como o baço. Por exemplo, viu-se que após uma a duas semanas de intoxicação com cuprizona houve uma redução significativa no número de células T tímicas e esplênicas (SEN et al., 2019a). Apesar da atrofia causada pela intoxicação com CPZ, Kaddatz e colaboradores (2021) mostraram um predomínio de células T CD8 no SNC, indicando um meio pró-inflamatório em camundongos intoxicados por CPZ. (KADDAZ et al., 2021). Isso simula a EM progressiva, já que se sugere que esta forma clínica ocorra pela ativação de microglia e astrócitos, sem a ruptura da BBB (FAISSNER et al., 2019).

Ao avaliar os efeitos do tratamento com pranlucaste, viu-se que ele não mostrou eficácia em restaurar o peso dos baços aos níveis do grupo controle, sugerindo que esse fármaco não foi capaz de reverter a atrofia induzida pela cuprizona. A literatura carece de estudos específicos que avaliem os efeitos do pranlucaste no baço, mas a ausência de recuperação do peso neste trabalho pode indicar que sua ação terapêutica não se estende à reversão de danos imunológicos periféricos causados por agentes tóxicos como a cuprizona, o que pode ser condizente com a redução do ambiente inflamatório no SNC mostrado na literatura (ICHIYAMA et al., 2003).

Por outro lado, o tratamento com fingolimode mostrou efeitos significativos na recuperação do peso do baço. Sabe-se que o fingolimode age retendo os linfócitos T autorreativos nos órgãos linfáticos periféricos, incluindo o baço, prevenindo sua migração para o sistema nervoso central (BORDET et al., 2020). Esse mecanismo pode contribuir para a redução da quantidade de linfócitos T recrutados para o SNC que são responsáveis pela progressão da doença. Acredita-se que não é a desmielinização aguda o principal desencadeador do recrutamento de células imunes periféricas, mas sim a indução de vias pró-inflamatórias devido à lesão metabólica gerada nos OLs (KADDAZ et al., 2021). Assim, a recuperação do peso dos baços pelo fingolimode neste atual trabalho pode sugerir uma maior retenção de células imunes nesse órgão linfoide, contribuindo para a diminuição dos efeitos pró-inflamatórios da cuprizona no SNC e, conseqüentemente, para a melhora da função sensitiva e da excitabilidade como já discutido anteriormente.

Quanto à análise do número de nódulos linfáticos nos baços não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Este resultado sugere que, embora a cuprizona e o pralucaste tenham mostrado uma redução dos baços e o fingolimode tenha preservado os pesos, não houve impacto substancial na estrutura dos nódulos linfáticos. Da mesma forma, a relação entre a polpa branca e a área total dos baços também não mostrou variação significativa entre os grupos, indicando que a composição histológica do baço, no que diz respeito à proporção de polpa branca, permaneceu estável independentemente dos tratamentos.

A manutenção da estrutura dos nódulos linfáticos e da relação polpa branca/área total sugere que a função imunológica básica do baço pode não estar completamente explorada, apesar da redução no peso do órgão. Estudos futuros poderiam focar em avaliar a funcionalidade das células imunológicas no baço e a capacidade de resposta a desafios imunológicos adicionais para uma compreensão mais abrangente do impacto da cuprizona e dos tratamentos subsequentes. Além disso, para melhor entender a complexidade da fisiopatologia da EM, é crucial investigar o potencial dos fármacos que possam oferecer proteção e recuperação do SNC a partir de interferências no sistema imunológico periférico.

6. CONCLUSÃO

A presente tese investigou os efeitos dos tratamentos com pranlucaeste e fingolimode em um modelo animal de Esclerose Múltipla induzido por intoxicação com CPZ. Os principais achados deste estudo podem ser resumidos nos seguintes pontos:

- Reproduzimos um modelo animal de EM que apresenta: desmielinização com redução do número de fibras mielínicas e aumento de anormalidades de mielina, diminuição da razão-g, morte de OLs, aumento de OPCs, diminuição da função sensitiva, alterações em segmentos excitáveis de axônio, aumento da predisposição a convulsões e atrofia dos baços.
- Ambos os tratamentos mostraram efeitos protetores contra a perda de peso, função sensitiva e predisposição a convulsões.
- O fingolimode foi capaz de preservar um maior número de fibras com valores ideais para razão-g, o que não foi observado com pranlucaeste.
- O fingolimode protegeu tanto contra a perda de lipídios quanto da MBP no CC dos animais tratados, além de ter atuado contra a perda de fibras mielínicas e o aumento de anormalidades de mielina. Entretanto, apesar do pranlucaeste ter protegido contra a perda de MBP e formação de anormalidades de mielina, não preservou o número de fibras mielínicas. Logo, o tratamento com fingolimode demonstrou ser mais eficiente na preservação da estrutura da mielina em comparação com o pranlucaeste.
- O tratamento com fingolimode ou pranlucaeste não protegeu contra a perda de OLs assim como também não estimulou ao aumento de OPCs.
- A intoxicação com CPZ não resultou em alterações nos níveis de potássio, mas o tratamento com pranlucaeste ou fingolimode reduziu a concentração de potássio extracelular no meio de cultura, sugerindo um mecanismo em comum para a redução da excitabilidade cerebral. Entretanto, o efeito nos segmentos excitáveis dos axônios nos animais tratados com esses fármacos ocorreu de forma distinta, em que o fingolimode protegeu contra a diminuição dos canais Nav1.6.

- A intoxicação com cuprizona resultou em atrofia do baço, refletindo a toxicidade sistêmica da substância além de sua ação desmielinizante no SNC. O tratamento com pranlucaeste não foi eficaz em reverter a atrofia do baço, sugerindo que seu efeito terapêutico não se estende aos danos imunológicos periféricos causados pela cuprizona. O fingolimode, por outro lado, mostrou efeitos significativos na recuperação do peso do baço.

Em suma, os resultados desta tese sugerem que tanto o pranlucaeste quanto o fingolimode possuem capacidade terapêutica na Esclerose Múltipla (EM), especialmente em casos com distúrbios sensoriais e convulsões. O pranlucaeste destaca-se como uma promissora opção para ser utilizado como fármaco modificador de doença na EM. O fingolimode, por sua vez, demonstrou maior eficácia na preservação da estrutura da mielina e na manutenção de segmentos excitáveis. Entretanto, ambos os fármacos compartilharam um mecanismo comum de proteção contra a excitabilidade neuronal, por meio da redução do potássio extracelular. Esses achados fornecem uma base sólida para futuras investigações clínicas e farmacológicas visando melhorar os tratamentos disponíveis para pacientes com EM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, F. et al. Preferential Loss of Myelin-Associated Glycoprotein Reflects Hypoxia-Like White Matter Damage in Stroke and Inflammatory Brain Diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 62, n. 1, p. 25–33, 1 jan. 2003.

ADIELE, R. C.; ADIELE, C. A. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion*, v. 44, p. 7–14, jan. 2019.

AGGARWAL, S.; YURLOVA, L.; SIMONS, M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends in Cell Biology*, v. 21, n. 10, p. 585–593, out. 2011.

AGNATI, L. F. et al. Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, v. 69, n. 3, p. 711–726, dez. 1995.

ALBERT, M. et al. Extensive Cortical Remyelination in Patients with Chronic Multiple Sclerosis. *Brain Pathology*, v. 17, n. 2, p. 129–138, 22 abr. 2007.

ALCAMI, P.; EL HADY, A. Axonal Computations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, 18 set. 2019.

ALLEN, A. N.; SEMINOG, O. O.; GOLDACRE, M. J. Association between multiple sclerosis and epilepsy: large population-based record-linkage studies. *BMC Neurology*, v. 13, n. 1, p. 189, 4 dez. 2013.

ALME, M. N., AGNES, E. N., LARS B., KJELL-MORTEN, M., CHRISTIAN, A. V., STIG, W., LIVIND, T. Fingolimod does not enhance cerebellar remyelination in the cuprizone model. *Journal of Neuroimmunology*. v. 285, p. 180–186, 2015.

ALMUSLEHI, M. S. M. et al. CD8 T-cell Recruitment Into the Central Nervous System of Cuprizone-Fed Mice: Relevance to Modeling the Etiology of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 14, 10 mar. 2020.

AMANAT, M.; THIJIS, R. D.; SALEHI, M.; SANDER, J. W. Seizures as a clinical manifestation in somatic autoimmune disorders. *Seizure*, [S.l.], v. 64, p. 59-64, jan. 2019.

DE SÁ, A. B. M. Efeitos do pranlucaste nas alterações fisiopatológicas de modelo animal de esclerose múltipla. 2024. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual Do Norte Fluminense - UENF, Campos dos Goytacazes – RJ, 2024.

ANDERSON, L. L. et al. Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current. *Epilepsia*, v. 55, n. 8, p. 1274–1283, 23 ago. 2014.

ARANCIBIA-CARCAMO, I. L.; ATTWELL, D. The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathologica*, v. 128, n. 2, p. 161–175, 10 ago. 2014.

ARAÚJO, S. E. S. et al. Inflammatory Demyelination Alters Subcortical Visual Circuits. *Journal of Neuroinflammation*. v. 14, p. 162, 2017.

AUGUSTE, Y. S. S.; FERRO, A.; KAHNG, J. A. et al. Oligodendrocyte precursor cells engulf synapses during circuit remodeling in mice. *Nature Neuroscience*, v. 25, p. 1273–1278, 2022.

- BACMEISTER, C. M.; BARR, H. J.; MCCLAIN, C. R.; THORNTON, M. A.; NETTLES, D.; WELLE, C. G.; HUGHES, E. G. Motor learning promotes remyelination via new and surviving oligodendrocytes. *Nature Neuroscience*, v. 23, n. 7, p. 819-831, jul. 2020.
- BAGCHI, B. et al. Disruption of Myelin Leads to Ectopic Expression of KV1.1 Channels with Abnormal Conductivity of Optic Nerve Axons in a Cuprizone-Induced Model of Demyelination. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e87736, 3 fev. 2014.
- BALOSSO, S. et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1. *Brain*, v. 131, n. 12, p. 3256–3265, 1 dez. 2008.
- BARCELOS, I. P. DE; TROXELL, R. M.; GRAVES, J. S. Mitochondrial Dysfunction and Multiple Sclerosis. *Biology*, v. 8, n. 2, p. 37, 11 maio 2019.
- BASU, K. et al. Difference in axon diameter and myelin thickness between excitatory and inhibitory callosally projecting axons in mice. *Cerebral Cortex*, v. 33, n. 7, p. 4101–4115, 21 mar. 2023.
- BEITER, R. M., RIVET-NOOR, C., MERCHAK, A. R., BAI, R., JOHANSON, D. M., SLOGAR, E., SOL-CHURCH, K., OVERALL, C. C., GAULTIER, A. Evidence for oligodendrocyte progenitor cell heterogeneity in the adult mouse brain. *Scientific Reports*, v. 12, n. 1, p. 12921, 28 jul. 2022.
- BENIAC, D. R.; WOOD, D. D.; PALANIYAR, N.; OTTENSMEYER, F. P.; MOSCARELLO, M. A.; HARAUZ, G. Marburg's variant of multiple sclerosis correlates with a less compact structure of myelin basic protein. *Molecular Cell Biology Research Communications*, v. 1, n. 1, p. 48-51, abr. 1999.
- BERCURY, K. K.; MACKLIN, W. B. Dynamics and Mechanisms of CNS Myelination. *Developmental Cell*, v. 32, n. 4, p. 447–458, fev. 2015.
- BERGHOFF, S. A; SPIETH, L., SUN, T., HOSANG, L., DEPP, C., SASMITA, A. O., VASILEVA, M. H., SCHOLZ, P., ZHAO, Y., KRUEGER-BURG, D., WICHERT, S., BROWN, E. R., MICHAIL, K., NAVE, K. A., BONN, S., ODOARDI, F., ROSSNER, M., ISCHEBECK, T., EDGAR, J. M., & SAHER, G. Neuronal cholesterol synthesis is essential for repair of chronically demyelinated lesions in mice. *Cell Reports*, v. 37, n. 4, p. 109889, out. 2021.
- BLAKEMORE, W. F. Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprizone. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 20, n. 1, p. 63–72, set. 1973.
- BLAKEMORE, W. F. Observations on oligodendrocyte degeneration, the resolution of status spongiosus and remyelination in cuprizone intoxication in mice. *Journal of Neurocytology*, v. 1, n. 4, p. 413–426, dez. 1972.
- BLUMENFELD KAN, S. et al. HDL-cholesterol elevation associated with fingolimod and dimethyl fumarate therapies in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical*, v. 5, n. 4, p. 205521731988272, 14 out. 2019.
- BOGGS, J. M. et al. Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles. *Journal of Neuroscience Research*, v. 57, n. 4, p. 529–535, 15 ago. 1999.

- BOGGS, J. M. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 17, p. 1945–1961, 23 set. 2006.
- BOGGS, J. M.; RANGARAJ, G.; KOSHY, K. M.; ACKERLEY, C.; WOOD, D. D.; MOSCARELLO, M. A. Highly deiminated isoform of myelin basic protein from multiple sclerosis brain causes fragmentation of lipid vesicles. *J Neurosci Res*, v. 57, n. 4, p. 529-535, 15 ago. 1999.
- BOIKO, T. et al. Compact Myelin Dictates the Differential Targeting of Two Sodium Channel Isoforms in the Same Axon. *Neuron*, v. 30, n. 1, p. 91–104, abr. 2001.
- BÖLCSKEI, K. et al. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *Journal of Neuroimmunology*, v. 320, p. 1–10, jul. 2018.
- BORDET, R. et al. Mechanism of action of s1p receptor modulators in multiple sclerosis: The double requirement. *Revue Neurologique*, v. 176, n. 1–2, p. 100–112, jan. 2020.
- BRADL, M.; LASSMANN, H. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.*, v. 119, n. 1, p. 37-53, jan. 2010.
- BRINKMANN, V.; CYSTER, J. G.; HLA, T. FTY720: Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function. *American Journal of Transplantation*, v. 4, n. 7, p. 1019–1025, jul. 2004.
- BUNGE, M. B. et al. A light and electron microscope study of long-term organized cultures of rat dorsal root ganglia. *The Journal of Cell Biology*, v. 32, n. 2, p. 439–466, 1 fev. 1967.
- BUNGE, M. B.; BUNGE, R. P.; PAPPAS, G. D. Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *The Journal of Cell Biology*, v. 12, n. 2, p. 448–453, 1 fev. 1962.
- BUNGE, R. P.; BUNGE, M. B.; PETERSON, E. R. An electron microscope study of cultured rat spinal cord. *The Journal of Cell Biology*, v. 24, n. 2, p. 163–191, 1 fev. 1965.
- BUTLER, R.; BRADFORD, D.; RODGERS, K. E. Analysis of shared underlying mechanism in neurodegenerative disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 14, 29 nov. 2022.
- CAMPBELL, I. L. et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, n. 21, p. 10061–10065, nov. 1993.
- CARRILLO-BARBERÀ, P. et al. AimSeg: A machine-learning-aided tool for axon, inner tongue and myelin segmentation. *PLOS Computational Biology*, v. 19, n. 11, p. e1010845, 17 nov. 2023.
- CHANG, K.-J.; REDMOND, S. A.; CHAN, J. R. Remodeling myelination: implications for mechanisms of neural plasticity. *Nature Neuroscience*, v. 19, n. 2, p. 190–197, 27 fev. 2016.
- CHEVER, O. et al. Implication of Kir 4.1 Channel in Excess Potassium Clearance: An In Vivo Study on Anesthetized Glial-Conditional Kir 4.1 Knock-Out Mice. *The Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 47, p. 15769–15777, 24 nov. 2010.

- CHKLOVSKII, D. B.; SCHIKORSKI, T.; STEVENS, C. F. Wiring Optimization in Cortical Circuits. *Neuron*, v. 34, n. 3, p. 341–347, abr. 2002.
- CHOMIAK, T.; HU, B. What Is the Optimal Value of the g-Ratio for Myelinated Fibers in the Rat CNS? A Theoretical Approach. *PLoS ONE*, v. 4, n. 11, p. e7754, 13 nov. 2009.
- CHRAST, R. et al. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *Journal of Lipid Research*, v. 52, n. 3, p. 419–434, mar. 2011.
- CHRZANOWSKI, U. et al. Oligodendrocyte degeneration and concomitant microglia activation directs peripheral immune cells into the forebrain. *Neurochemistry International*, v. 126, p. 139–153, jun. 2019.
- CHUN, J.; HARTUNG, H.-P. Mechanism of Action of Oral Fingolimod (FTY720) in Multiple Sclerosis. *Clinical Neuropharmacology*, v. 33, n. 2, p. 91–101, mar. 2010.
- COMAN, I. et al. Nodal, paranodal and juxtapanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain*, v. 129, n. 12, p. 3186–3195, 9 jun. 2006.
- COMPSTON, A., COLES, A. Multiple sclerosis. *Lancet*. v. 372, p. 1502 – 1517, 2008.
- CRANER, M. J. Abnormal sodium channel distribution in optic nerve axons in a model of inflammatory demyelination. *Brain*, v. 126, n. 7, p. 1552–1561, 22 abr. 2003.
- CRANER, M. J. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain*, v. 127, n. 2, p. 294–303, 1 fev. 2004.
- CUSACK, K. P.; STOFFEL, R. H. S1P(1) receptor agonists: Assessment of selectivity and current clinical activity. *Current opinion in drug discovery & development*, v. 13, n. 4, p. 481–8, jul. 2010.
- DE CURTIS, M.; GARBELLI, R.; UVA, L. A hypothesis for the role of axon demyelination in seizure generation. *Epilepsia*, v. 62, n. 3, p. 583–595, 25 mar. 2021.
- DECKER, L.; FFRENCH-CONSTANT, C. Lipid Rafts and Integrin Activation Regulate Oligodendrocyte Survival. *The Journal of Neuroscience*, v. 24, n. 15, p. 3816–3825, 14 abr. 2004.
- DENISENKO-NEHRBASS, N. et al. Protein 4.1B associates with both Caspr/paranodin and Caspr2 at paranodes and juxtapanodes of myelinated fibres. *European Journal of Neuroscience*, v. 17, n. 2, p. 411–416, 10 jan. 2003.
- DI FILIPPO, M., DE IURE, A., DURANTE, V., GAETANI, L., MANCINI, A., SARCHIELLI, P., CALABRESI, P. Synaptic plasticity and experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Brain Research*. v. 13, p. 1621:205, 2015.
- DOAN, V. et al. Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. *Journal of Neuroscience Research*, v. 91, n. 3, p. 363–373, 26 mar. 2013.
- DUMÉNIÉU, M. et al. The Segregated Expression of Voltage-Gated Potassium and Sodium Channels in Neuronal Membranes: Functional Implications and Regulatory Mechanisms.

Frontiers in Cellular Neuroscience, v. 11, 24 abr. 2017.

DUNCAN, I. D.; RADCLIFF, A. B.; HEIDARI, M.; KIDD, G.; AUGUST, B. K.; WIERENGA, L. A. The adult oligodendrocyte can participate in remyelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 50, p. E11807-E11816, 11 dez. 2018.

DUPREE, J. L.; POMICTER, A. D. Myelin, DIGs, and membrane rafts in the central nervous system. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v. 91, n. 3–4, p. 118–129, abr. 2010.

ERBAS, O. Montelukast Inhibits Pentylentetrazol-Induced Seizures in Rats. *Medical Science Monitor*, v. 21, p. 869–874, 2015.

FAISSNER, S. et al. Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 18, n. 12, p. 905–922, 9 dez. 2019.

FERGUSON, B. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, v. 120, n. 3, p. 393–399, 1 mar. 1997.

FILIPPI, M., BAR-OR, A., PIEHL, F., PREZIOSA, P., SOLARI, A., VUKUSIC, S., & ROCCA, M. A. Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4(1), nov 2018.

FLECK, J. et al. Montelukast reduces seizures in pentylentetrazol-kindled mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 49, n. 4, 2016.

FRANKLIN, R. J. M. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, n. 9, p. 705–714, set. 2002.

FRANKLIN, R. J. M.; FFRENCH-CONSTANT, C. Regenerating CNS myelin — from mechanisms to experimental medicines. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 18, n. 12, p. 753–769, 16 dez. 2017.

FRANSSEN, H. Physiology of Myelinated Nerve Conduction and Pathophysiology of Demyelination. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 1190, p. 85–106, 2019.

FUMAGALLI, M., LECCA, D., COPPOLINO, G. T., PARRAVICINI, C., ABBRACCHIO, M. P. Pharmacological Properties and Biological Functions of the GPR17 Receptor, a Potential Target for Neuro-Regenerative Medicine. *Advances in experimental medicine and biology*, v. 1051, p. 169-192, 2017.

FUMAGALLI, M.; LECCA, D.; ABBRACCHIO, M. P. CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: The roles of purinergic signaling and the P2Y-like receptor GPR17. *Neuropharmacology*, v. 104, p. 82–93, maio 2016.

FÜNFSCHILLING U, SUPPLIE LM, MAHAD D, BORETIUS S, SAAB AS, EDGAR J, BRINKMANN BG, KASSMANN CM, TZVETANOVA ID, MÖBIUS W, DIAZ F, MEIJER D, SUTER U, HAMPRECHT B, SEREDA MW, MORAES CT, FRAHM J, GOEBBELS S, NAVE KA. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, v. 485, n. 7399, p. 517–521, 29 maio 2012.

GAO, F. et al. The Sphingosine 1-Phosphate Analogue FTY720 Alleviates Seizure-induced Overexpression of P-Glycoprotein in Rat Hippocampus. *Basic & Clinical Pharmacology &*

Toxicology, v. 123, n. 1, p. 14–20, 13 jul. 2018.

GEAN-MARTON, A. D. et al. Abnormal corpus callosum: a sensitive and specific indicator of multiple sclerosis. *Radiology*, v. 180, n. 1, p. 215–221, jul. 1991.

GIELEN E, BARON W, VANDEVEN M, STEELS P, HOEKSTRA D, AMELOOT M. Rafts in oligodendrocytes: Evidence and structure–function relationship. *Glia*, v. 54, n. 6, p. 499–512, 22 nov. 2006.

GOL, M. et al. Fingolimod enhances myelin repair of hippocampus in pentylenetetrazol-induced kindling model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, p. 72–83, jan. 2017.

GORDON, A. et al. Caspr and Caspr2 Are Required for Both Radial and Longitudinal Organization of Myelinated Axons. *The Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 45, p. 14820–14826, 5 nov. 2014.

GOULART, C. O., MENDONÇA, H.R., OLIVEIRA, J. T., SAVOLDI, L. M., HERINGER, L. S. RODRIGUES, A. S., PAES-DE-CARVALHO, R., MARTINEZ, A. M. B. Repulsive Environment Attenuation during Adult Mouse Optic Nerve Regeneration. *Neural Plasticity* (Online), v. 2018, p. 1-11, 2018.

GUDI, V. et al. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced demyelination. *Brain Research*, v. 1283, p. 127–138, ago. 2009.

HAMADA, M. S.; KOLE, M. H. P. Myelin Loss and Axonal Ion Channel Adaptations Associated with Gray Matter Neuronal Hyperexcitability. *The Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 18, p. 7272–7286, 6 maio 2015.

HENNEN, S. et al. Decoding Signaling and Function of the Orphan G Protein–Coupled Receptor GPR17 with a Small-Molecule Agonist. *Science Signaling*, v. 6, n. 298, 22 out. 2013.

HIBBITS, N., PANNU, R., WU, T. J., ET AL. Cuprizone demyelination of the corpus callosum in mice correlates with altered social interaction and impaired bilateral sensorimotor coordination. *Asn Neuro*. v.1, n. 3, 2009.

HIRANO, A. The role of electron microscopy in neuropathology. *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 115–123, 12 jan. 2005.

HOFFMANN, F. S. et al. Fingolimod induces neuroprotective factors in human astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, v. 12, n. 1, p. 184, 30 dez. 2015.

HOLZ, A.; BIELEKOVA, B.; MARTIN, R.; OLDSTONE, M. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: Identification of an encephalitogenic epitope and association with multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, v. 164, p. 1103–1109, 2000.

HU, Z.-W. et al. FTY720 Modulates Microglia Toward Anti-inflammatory Phenotype by Suppressing Autophagy via STAT1 Pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 41, n. 2, p. 353–364, 27 mar. 2021.

HUGHES, E. G. et al. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience*, v. 16, n. 6, p. 668–676, 28 jun.

2013.

ICHIYAMA, T. et al. Pranlukast inhibits NF- κ B activation in human monocytes/macrophages and T cells. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 33, n. 6, p. 802–807, 10 jun. 2003.

INEICHEN, B. V. et al. Sudan black: a fast, easy and non-toxic method to assess myelin repair in demyelinating diseases. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 43, n. 3, p. 242–251, 10 abr. 2017.

ISHIBASHI, T.; BABA, H. Paranodal Axoglial Junctions, an Essential Component in Axonal Homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 10, 6 jul. 2022.

ITOYAMA, Y. et al. Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, v. 7, n. 2, p. 167–177, 7 fev. 1980.

JAHN, O., SIEMS, S. B., KUSCH, K., HESSE, D., JUNG, R. B., LIEPOLD, T., UECKER, M., SUN, T., & WERNER, H. B. The CNS Myelin Proteome: Deep Profile and Persistence After Post-mortem Delay. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 239. 2020.

JOHNSON, E. S.; LUDWIN, S. K. Evidence for a “dying-back” gliopathy in demyelinating disease. *Annals of Neurology*, v. 9, n. 3, p. 301–305, 7 mar. 1981.

JUDGE, S. I. V.; BEVER, C. T. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 111, n. 1, p. 224–259, jul. 2006.

KADDATZ, H. et al. Cuprizone-induced demyelination triggers a CD8-pronounced T cell recruitment. *Glia*, v. 69, n. 4, p. 925–942, 27 abr. 2021.

KAISER, T. et al. MyelTracer: A Semi-Automated Software for Myelin g -Ratio Quantification. *Eneuro*, v. 8, n. 4, p. ENEURO.0558-20.2021, jul. 2021.

KANDA, H. et al. TREK-1 and TRAAK Are Principal K⁺ Channels at the Nodes of Ranvier for Rapid Action Potential Conduction on Mammalian Myelinated Afferent Nerves. *Neuron*, v. 104, n. 5, p. 960- 971.e7, dez. 2019.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J.; MACK, S. (ed.). Principles of Neural Science. 5. ed. New York: McGraw-Hill Education, 2014.

KAPPELL, H. et al. Neuron-oligodendrocyte potassium shuttling at nodes of Ranvier protects against inflammatory demyelination. *Journal of Clinical Investigation*, v. 133, n. 7, 3 abr. 2023.

KAZI, A. Z. et al. MRI evaluation of pathologies affecting the corpus callosum: A pictorial essay. *Indian Journal of Radiology and Imaging*, v. 23, n. 04, p. 321–332, 30 out. 2013.

KILGORE J. Lipophilic dyes and their application for detection of myelin. US Patent Application Pub. No: US 2006/0073541 A1. Appl. No. 11/241,323. Filed Sept 30, 2005. Patent pending 2006.

KIM, H. J., VERONIGUE, E. M., DANUTA, D., PROIA, R. L., LUDWIN, S. K., TRAKA, M., ANTEL, J. P., SOLIVEN, B. Neurobiological effects of sphingosine 1-phosphate receptor modulation in the cuprizone model. *Faseb Journal*. v.25, n.5, p.1509-1518, 2011.

KINBOSHI, M.; IKEDA, A.; OHNO, Y. Role of Astrocytic Inwardly Rectifying Potassium (Kir) 4.1 Channels in Epileptogenesis. *Frontiers in Neurology*, v. 11, 23 dez. 2020.

KIPP, M. et al. The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta Neuropathologica*, v. 118, n. 6, p. 723–736, 18 dez. 2009.

KIPP, M. et al. The hippocampal fimbria of cuprizone-treated animals as a structure for studying neuroprotection in multiple sclerosis. *Inflammation Research*, v. 60, n. 8, p. 723–726, 24 ago. 2011.

KIPP, M., AMOR, S. FTY720 on the way from the base camp to the summit of the mountain: relevance for remyelination. *Mult Scler*. v.18, p. 258–263, 2012.

KIPP, M., NYAMOYA, S., HOCHSTRASSER, T., AMOR, S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathology*. 2016.

KIRBY BB, TAKADA N, LATIMER AJ, SHIN J, CARNEY TJ, KELSH RN, APPEL B. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature Neuroscience*. 2006 Dec;9(12):1506-11.

KISTER, A.; KISTER, I. Overview of myelin, major myelin lipids, and myelin-associated proteins. *Frontiers in Chemistry*, v. 10, 21 fev. 2023.

KOFUJI, P.; NEWMAN, E. A. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, v. 129, n. 4, p. 1043–1054, jan. 2004.

LAMANTIA, A. -S.; RAKIC, P. Cytological and quantitative characteristics of four cerebral commissures in the rhesus monkey. *Journal of Comparative Neurology*, v. 291, n. 4, p. 520–537, 22 jan. 1990.

LAMARI, F.; MOCHEL, F.; SEDEL, F.; SAUDUBRAY, J. M. Disorders of phospholipids, sphingolipids, and fatty acids biosynthesis: toward a new category of inherited metabolic diseases. *Journal of Inherited Metabolic Diseases*, v. 36, n. 3, p. 411-425, 20 maio 2013.

LAPATO, A.S., SZU, J.I., HASSELMANN, J.P.C., KHALAJ, A.J., BINDER, D.K., TIWARI-WOODRUFF, S.K. Chronic demyelination-induced seizures. *Neuroscience*. v. 346, p. 409-422, mar. 2017.

LAPPE-SIEFKE, C.; GOEBBELS, S.; GRAVEL, M.; NICKSCH, E.; LEE, J.; BRAUN, P. E.; GRIFFITHS, I. R.; NAVE, K. A. Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature Genetics*, v. 33, p. 366–374, 2003.

LASSMANN H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2013.

LASSMANN, H.; BRÜCK, W.; LUCCHINETTI, C. F. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathology*, v. 17, p. 210-218, 2007.

LAULE, C.; MOORE, G. R. W. Myelin water imaging to detect demyelination and remyelination and its validation in pathology. *Brain Pathology*, v. 28, n. 5, p. 750–764, 29 set. 2018.

LEE, Y. et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, v. 487, n. 7408, p. 443–448, 11 jul. 2012.

LEMAILLET, G.; WALKER, B.; LAMBERT, S. Identification of a Conserved Ankyrin-binding Motif in the Family of Sodium Channel α Subunits. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 30, p. 27333–27339, jul. 2003.

LENZ, Q. F. et al. Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylentetrazol-induced seizures and blood–brain barrier dysfunction. *Neuroscience*, v. 277, p. 859–871, set. 2014.

LEO, A.; CITRARO, R.; MARRA, R.; PALMA, E.; PAOLA, E.D.D.; CONSTANTINI, A.; DE SARRO, G.; RUSSO, E. The Sphingosine 1-Phosphate Signaling Pathway in Epilepsy: A Possible Role for the Immunomodulator Drug Fingolimod in Epilepsy Treatment. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. vol. 16, n. 3, p. 311–325, 2017.

LETERRIER, C. The Axon Initial Segment: An Updated Viewpoint. *The Journal of Neuroscience*, v. 38, n. 9, p. 2135–2145, 28 fev. 2018.

LEVY-MOZZICONACCI, A. et al. Expression of the mRNA for the β 2 subunit of the voltage-dependent sodium channel in rat CNS. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 9, p. 2757–2767, 15 set. 1998.

LI, B.; ZHUANG, Q.-X.; GAO, H.-R.; WANG, J.-J.; ZHU, J.-N. Medial cerebellar nucleus projects to feeding-related neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Structure and Function*, v. 222, n. 2, p. 957–971, 24 mar. 2017.

LONGBRAKE, E. Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein–Associated Disorders. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, v. 28, n. 4, p. 1171–1193, ago. 2022.

LÓPEZ-MUGURUZA, E.; MATUTE, C. Alterations of Oligodendrocyte and Myelin Energy Metabolism in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 16, p. 12912, 18 ago. 2023.

LU, S. et al. IL-6 promotes the activation of rat astrocytes and down-regulation of the expression of Kir4.1 channel. Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = *Chinese journal of cellular and molecular immunology*, v. 38, n. 4, p. 316–320, abr. 2022.

LÜDERS, K. A. et al. Maintenance of high proteolipid protein level in adult central nervous system myelin is required to preserve the integrity of myelin and axons. *Glia*, v. 67, n. 4, p. 634–649, 14 abr. 2019.

MAHAD, D. et al. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, v. 131, n. 7, p. 1722–1735, jul. 2008.

MARIE-THERES WEIL. The molecular mechanisms of myelin disassembly. *Göttingen: University Göttingen*, 10 fev. 2016.

MARRIE, R. A.; REIDER, N.; COHEN, J. et al. A systematic review of the incidence and prevalence of sleep disorders and seizure disorders in multiple sclerosis. In: MARRIE, R. A. (ed.). *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, v. 21, n. 3, p. 342-349, 2015.

MARTINSEN, V.; KURSULA, P. Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease. *Amino Acids*, v. 54, n. 1, p. 99–109, 10 jan. 2022.

MATSUSHIMA, G. K.; MORELL, P. The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, v. 11, n. 1, p. 107–116, 5 jan. 2001

MENDONÇA, H. R., CARVALHO, J. N. A., ABREU, C. A., MARIANO DE, S. A. DOS SANTOS, D., CARVALHO, J. R., MARQUES, S. A., DA COSTA, C. K., MARTINEZ, A. M. B. Lack of Galectin-3 attenuates neuroinflammation and protects the retina and optic nerve of diabetic mice. *Brain Research*, v. 1700, p. 126-137, 2018.

MESSORI, L. et al. Unravelling the chemical nature of copper cuprizone. *Dalton Transactions*, n. 21, p. 2112, 2007.

MICHEVA, K. D. et al. A large fraction of neocortical myelin ensheathes axons of local inhibitory neurons. *eLife*, v. 5, 6 jul. 2016.

MIRON, V. E. et al. Cyclical and Dose-Dependent Responses of Adult Human Mature Oligodendrocytes to Fingolimod. *The American Journal of Pathology*, v. 173, n. 4, p. 1143–1152, out. 2008.

MONTAGUE, P.; MCCALLION, A. S.; DAVIES, R. W.; GRIFFITHS, I. R. Myelin-associated oligodendrocytic basic protein: a family of abundant CNS myelin proteins in search of a function. *Developmental Neuroscience*, v. 28, n. 6, p. 479-487, 2006.

MONTANI, L. Lipids in regulating oligodendrocyte structure and function. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 112, p. 114–122, abr. 2021.

MOSCARELLO, M. A. Myelin basic protein, the 'executive' molecule of the myelin membrane. In: Juurlink, B. H. J. et al. (Eds.). *Cell biology and pathology of myelin: Evolving biological concepts and therapeutic approaches*. New York: *Plenum*, 1997. p. 13–25.

MOSTACADA, K., OLIVEIRA, F. L., VILLA-VERDE, D. M. S. ; MARTINEZ, A. M. B. Lack of galectin-3 improves the functional outcome and tissue sparing by modulating inflammatory response after a compressive spinal cord injury. *Experimental Neurology*, v. 271, p. 390-340, 2015.

MOYON, S.; DUBESSY, A. L.; AIGROT, M. S.; TROTTER, M.; HUANG, J. K.; DAUPHINOT, L.; POTIER, M. C.; KERNINON, C.; MELIK PARSADANIANTZ, S.; FRANKLIN, R. J.; LUBETZKI, C. Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. *The Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 1, p. 4-20, 7 jan. 2015.

MRAK, R. E. The Big Eye in the 21st Century: The Role of Electron Microscopy in Modern Diagnostic Neuropathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, v. 61, n. 12, p. 1027–1039, 1 dez. 2002.

MURAYAMA, S.; SAITO, Y. Neuropathology of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo*, v. 59, n. 2, p. 119–24, fev. 2007.

NICHOLSON, C. Volume transmission in the year 2000. *Progress in brain research*, v. 125, p. 437–446, 2000.

NICOSIA, S. Pharmacodynamic properties of leukotriene receptor antagonists. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace*, v. 54, n. 3, p. 242–6, jun. 1999.

NOSEWORTHY, J.H., LUCCHINETTI, C., RODRIGUEZ, M., WEINSHENKER, B.G. Medical Progress – Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* v. 343, p. 938-52, 2000.

NOVARTIS BIOCIEŃCIAS S.A. *Gilenya* - bula. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/>.

NYAMOYA, S., LEOPOLD, P., BECKER, B., BEYER, C., HUSTADT, F., SCHMITZ, C., MICHEL, A., KIPP, M. G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Expression in Two Multiple Sclerosis Remyelination Models. *Molecular Neurobiology*, 5 June 2018, pp.1-15.

O'LOUGHLIN, E., MADORE, C., LASSMANN, H., BUTOVSKY, O. Microglial Phenotypes and Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* February 2018.

OLŻYŃSKA, A. et al. Tail-Oxidized Cholesterol Enhances Membrane Permeability for Small Solutes. *Langmuir*, v. 36, n. 35, p. 10438–10447, 8 set. 2020.

OSORIO-QUEREJETA, I. et al. Models for Studying Myelination, Demyelination and Remyelination. *NeuroMolecular Medicine*, v. 19, n. 2–3, p. 181–192, 23 set. 2017.

OU, Z. et al. Olig2-Targeted G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Regulates Oligodendrocyte Survival in Response to Lysolecithin-Induced Demyelination. *The Journal of Neuroscience*, v. 36, n. 41, p. 10560–10573, 12 out. 2016.

PAN, B. et al. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Experimental Neurology*, v. 195, n. 1, p. 208–217, set. 2005.

PAPANIKOLAOU, M.; LEWIS, A.; BUTT, A. M. Glial and neuronal expression of the Inward Rectifying Potassium Channel Kir7.1 in the adult mouse brain. *Journal of Anatomy*, v. 235, n. 5, p. 984–996, 15 nov. 2019.

PARTRIDGE, M. A. et al. An initial top-down proteomic analysis of the standard cuprizone mouse model of multiple sclerosis. *Journal of Chemical Biology*, v. 9, n. 1, p. 9–18, 12 jan. 2016.

PAUDEL, Y. N. et al. From the Molecular Mechanism to Pre-clinical Results: Anti-epileptic Effects of Fingolimod. *Current Neuropharmacology*, v. 18, n. 11, p. 1126–1137, 9 nov. 2020.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier, 2001.

PÉREZ-CERDÁ, F.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, M. V.; MATUTE, C. Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy*, v. 9, p.92, 7 jul. 2015.

PÉRIER, O.; GRÉGOIRE, A. Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions. *Brain*, v. 88, n. 5, p. 937–952, 1965.

PERROT, R. et al. Axonal Neurofilaments Control Multiple Fiber Properties But Do Not Influence Structure or Spacing of Nodes of Ranvier. *The Journal of Neuroscience*, v. 27, n. 36, p. 9573–9584, 5 set. 2007.

PESTANA, F. M.; DOMINGUES, R. C.; MENDONÇA, H. R.; OLIVEIRA, J. T.; DURCO, D.; PIAKSEC, C. B.; PEREIRA, C. C.; GOULART, C.O.; MARTINEZ, A. M. B. Comparison of morphological and functional outcomes of mouse sciatic nerve repair with three biodegradable polymer conduits containing poly(lactic acid). *Neural Regeneration Research*, v. 13, p. 1811, 2018.

PETERS, A. A fourth type of neuroglial cell in the adult central nervous system. *Journal of Neurocytology*, v. 33, n. 3, p. 345–357, maio 2004.

PITSCH, J. et al. Anti-epileptogenic and Anti-convulsive Effects of Fingolimod in Experimental Temporal Lobe Epilepsy. *Molecular Neurobiology*, v. 56, n. 3, p. 1825–1840, 22 mar. 2019.

POITELON, Y.; KOPEC, A. M.; BELIN, S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 812, 27 mar. 2020.

POLIAK, S. et al. Caspr2, a New Member of the Neurexin Superfamily, Is Localized at the Juxtaparanodes of Myelinated Axons and Associates with K⁺ Channels. *Neuron*, v. 24, n. 4, p. 1037–1047, dez. 1999.

QIN, C. et al. Fingolimod Protects Against Ischemic White Matter Damage by Modulating Microglia Toward M2 Polarization via STAT3 Pathway. *Stroke*, v. 48, n. 12, p. 3336–3346, dez. 2017.

RAIMONDO, J. V. et al. Ion dynamics during seizures. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 9, 21 out. 2015.

RAMA, S.; ZBILI, M.; DEBANNE, D. Signal propagation along the axon. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 51, p. 37–44, ago. 2018.

RASBAND, M. N. et al. K⁺ channel distribution and clustering in developing and hypomyelinated axons of the optic nerve. *Journal of Neurocytology*, v. 28, n. 4/5, p. 319–331, 1999.

RODRIGUEZ, M. et al. Oligodendrocyte Injury Is an Early Event in Lesions of Multiple Sclerosis. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 68, n. 7, p. 627–636, jul. 1993.

RUSH, A. M.; DIB-HAJJ, S. D.; WAXMAN, S. G. Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Na^v 1.2 and Na^v 1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones. *The Journal of Physiology*, v. 564, n. 3, p. 803–815, 21 maio 2005.

SAAB, A. S. et al. Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal

Energy Metabolism. *Neuron*, v. 91, n. 1, p. 119–132, jul. 2016.

SAKRY, D. et al. Oligodendrocyte Precursor Cells Modulate the Neuronal Network by Activity-Dependent Ectodomain Cleavage of Glial NG2. *PLoS Biology*, v. 12, n. 11, p. e1001993, 11 nov. 2014.

SEN, M. K. et al. Behavioural and histological changes in cuprizone-fed mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 87, p. 508–523, jul. 2020.

SEN, M. K. et al. Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 107, p. 23–46, dez. 2019b.

SEN, M. K. et al. Suppression of the Peripheral Immune System Limits the Central Immune Response Following Cuprizone-Feeding: Relevance to Modelling Multiple Sclerosis. *Cells*, v. 8, n. 11, p. 1314, 24 out. 2019.

SHINODA, W. Permeability across lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1858, n. 10, p. 2254–2265, out. 2016.

SIMONS, M. et al. Assembly of Myelin by Association of Proteolipid Protein with Cholesterol- and Galactosylceramide-Rich Membrane Domains. *The Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 1, p. 143–154, 2 out. 2000.

SIMONS, M.; NAVE, K.-A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 8, n. 1, p. a020479, jan. 2016.

SMIRNOVA, E. V. et al. Comprehensive Atlas of the Myelin Basic Protein Interaction Landscape. *Biomolecules*, v. 11, n. 11, p. 1628, 3 nov. 2021.

SMITH, R.; KOLES, Z. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, v. 219, n. 5, p. 1256–1258, 1 nov. 1970.

SNAIDERO, N.; VELTE, C.; MYLLYKOSKI, M.; RAASAKKA, A.; IGNATEV, A.; WERNER, H. B.; ERWIG, M. S.; MÖBIUS, W.; KURSULA, P.; NAVE, K. A.; SIMONS, M. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep.*, v. 18, n. 2, p. 314–323, 10 jan. 2017.

SOLTI, I. et al. Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4⁺CD8⁺ Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. *PLOS ONE*, v. 10, n. 6, p. e0129217, 8 jun. 2015.

SOMJEN, G. G. Ion Regulation in the Brain: Implications for Pathophysiology. *The Neuroscientist*, v. 8, n. 3, p. 254–267, 29 jun. 2002.

SOMJEN, G. G.; MÜLLER, M. Potassium-induced enhancement of persistent inward current in hippocampal neurons in isolation and in tissue slices. *Brain Research*, v. 885, n. 1, p. 102–110, dez. 2000.

SPAAS, J.; VAN VEGGEL, L.; SCHEPERS, M.; TIANE, A.; VAN HORSSSEN, J.; WILSON, D. M. 3rd; MOYA, P. R.; PICCART, E.; HELLINGS, N.; EIJNDE, B. O.; DERAIVE, W.; SCHREIBER, R.; VANMIERLO, T. Oxidative stress and impaired oligodendrocyte precursor cell differentiation in neurological disorders. *Cellular and*

Molecular Life Sciences, v. 78, n. 10, p. 4615–4637, maio 2021.

STADELMANN, C. et al. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological Reviews*, v. 99, n. 3, p. 1381–1431, 1 jul. 2019.

STASSART, R. M. et al. The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. *Frontiers in Neuroscience*, v. 12, 11 jul. 2018.

STECK, A. J. Anti-MAG neuropathy: from biology to clinical management. *Journal of Neuroimmunology*, v. 361, p. 577725, 2021.

STEDERHOUDER, J. et al. Fast-spiking Parvalbumin Interneurons are Frequently Myelinated in the Cerebral Cortex of Mice and Humans. *Cerebral Cortex*, v. 27, n. 10, p. 5001–5013, 1 out. 2017

STOFFEL, W.; BOSIO, A. Myelin glycolipids and their functions. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 7, n. 5, p. 654–661, out. 1997.

STORCH, M. K. et al. Autoimmunity to Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein in Rats Mimics the Spectrum of Multiple Sclerosis Pathology. *Brain Pathology*, v. 8, n. 4, p. 681–694, 5 out. 1998.

TAKAHASHI, Y. et al. Open study of pranlukast add-on therapy in intractable partial epilepsy. *Brain and Development*, v. 35, n. 3, p. 236–244, mar. 2013.

TESFAYE, B. A. et al. Montelukast: The New Therapeutic Option for the Treatment of Epilepsy. *Journal of Experimental Pharmacology*, v. Volume 13, p. 23–31, jan. 2021.

THERON, A. J. et al. Cysteinyl Leukotriene Receptor-1 Antagonists as Modulators of Innate Immune Cell Function. *Journal of Immunology Research*, v. 2014, p. 1–16, 2014.

TORKILDSEN, Ø. et al. The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurologica Scandinavica*, v. 117, n. s188, p. 72–76, maio 2008.

TRÄGER, J.; WIDDER, K.; KERTH, A.; HARAUZ, G.; HINDERBERGER, D. Effect of Cholesterol and Myelin Basic Protein (MBP) Content on Lipid Monolayers Mimicking the Cytoplasmic Membrane of Myelin. *Cells*, v. 9, n. 3, p. 529, 25 fev. 2020.

TRAPP, B. D. Myelin-Associated Glycoprotein Location and Potential Functions a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 605, n. 1, p. 29–43, 17 nov. 1990.

TSUKAHARA, R. et al. LPA5 signaling is involved in multiple sclerosis-mediated neuropathic pain in the cuprizone mouse model. *Journal of Pharmacological Sciences*, v. 136, n. 2, p. 93–96, fev. 2018.

UNTERBERGER, I. et al. Corpus callosum and epilepsies. *Seizure*, v. 37, p. 55–60, abr. 2016.

VAKILZADEH, G. et al. The Effect of Melatonin on Behavioral, Molecular, and Histopathological Changes in Cuprizone Model of Demyelination. *Molecular Neurobiology*, v. 53, n. 7, p. 4675–4684, 27 set. 2016.

VAN DEN BOSCH, A. M. R. et al. Ultrastructural Axon–Myelin Unit Alterations in Multiple

Sclerosis Correlate with Inflammation. *Annals of Neurology*, v. 93, n. 4, p. 856–870, 5 abr. 2023.

VAN HARREVELD, A.; CROWELL, J.; MALHOTRA, S. K. A study of extracellular space in central nervous tissue by freeze-substitution. *The Journal of Cell Biology*, v. 25, n. 1, p. 117–137, 1 abr. 1965.

VELUMIAN, A. A.; SAMOILOVA, M.; FEHLINGS, M. G. Visualization of cytoplasmic diffusion within living myelin sheaths of CNS white matter axons using microinjection of the fluorescent dye Lucifer Yellow. *NeuroImage*, v. 56, n. 1, p. 27–34, maio 2011.

VEZZANI, A. et al. Interleukin-1 β Immunoreactivity and Microglia Are Enhanced in the Rat Hippocampus by Focal Kainate Application: Functional Evidence for Enhancement of Electrographic Seizures. *The Journal of Neuroscience*, v. 19, n. 12, p. 5054–5065, 15 jun. 1999.

VEZZANI, A. Inflammation and Epilepsy. *Epilepsy Currents*, v. 5, n. 1, p. 1–6, 13 jan. 2005.

WADDELL, P. J.; LAWSON, S. N. Electrophysiological properties of subpopulations of rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuroscience*, v. 36, n. 3, p. 811–822, jan. 1990.

WALTON, C. et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal*, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 11 dez. 2020.

WANG, H.; LI, C.; WANG, H.; MEI, F.; LIU, Z.; SHEN, H. Y.; XIAO, L. Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit. *Neuroscience bulletin*. v. 29, n. 2, p. 251–259, 2013.

WANG, L. et al. Extracellular Potassium and Seizures: Excitation, Inhibition and the Role of Ih. *International Journal of Neural Systems*, v. 26, n. 08, p. 1650044, 4 dez. 2016.

WAXMAN, S. G.; RITCHIE, J. M. Molecular dissection of the myelinated axon. *Annals of Neurology*, v. 33, n. 2, p. 121–136, 8 fev. 1993.

WHEELER, D. et al. A defect of sphingolipid metabolism modifies the properties of normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain*, v. 131, n. 11, p. 3092–3102, nov. 2008.

WOLSWIJK, G. Changes in the expression and localization of the paranodal protein Caspr on axons in chronic multiple sclerosis. *Brain*, v. 126, n. 7, p. 1638–1649, 22 abr. 2003.

WOLSWIJK, G. Oligodendrocyte survival, loss and birth in lesions of chronic-stage multiple sclerosis. *Brain*, v. 123, n. 1, p. 105–115, jan. 2000.

WOOD, D. D.; BILBAO, J. M.; O'CONNORS, P.; MOSCARELLO, M. A. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol*, v. 40, n. 1, p. 18–24, jul. 1996.

XIA, C.-Y. et al. Connexins in oligodendrocytes and astrocytes: Possible factors for demyelination in multiple sclerosis. *Neurochemistry International*, v. 136, p. 104731, jun. 2020.

XIN, W.; CHAN, J. R. Myelin plasticity: sculpting circuits in learning and memory. *Nature*

Reviews Neuroscience, v. 21, n. 12, p. 682–694, 12 dez. 2020.

XIU, Y. et al. Ultrastructural abnormalities and loss of myelinated fibers in the corpus callosum of demyelinated mice induced by cuprizone. *Journal of Neuroscience Research*, v. 95, n. 8, p. 1677–1689, 9 ago. 2017.

YAMAZAKI, Y. Oligodendrocyte physiology modulating axonal excitability and nerve conduction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1190, p. 123-144, 2019.

YEUNG, M. S. Y.; DJELLOUL, M.; STEINER, E.; BERNARD, S.; SALEHPOUR, M.; POSSNERT, G.; BRUNDIN, L.; FRISÉN, J. Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature*, v. 566, n. 7745, p. 538-542, fev. 2019.

YEUNG, M. S., ZDUNEK, S., BERGMANN, O., BERNARD, S., SALEHPOUR, M., ALKASS, K., PERL, S., TISDALE, J., POSSNERT, G., BRUNDIN, L., DRUID, H., FRISÉN, J. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*, v. 159, n. 4, p. 766-774, 6 nov. 2014.

YIN, X. et al. Myelin-Associated Glycoprotein Is a Myelin Signal that Modulates the Caliber of Myelinated Axons. *The Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 6, p. 1953–1962, 15 mar. 1998.

YONG, H.; CHARTIER, G.; QUANDT J. Modulating inflammation and neuroprotection in multiple sclerosis. *Journal of Neurology Research*. v. 00, p. 1–24, 2017.

ZAWADZKA, M. et al. CNS-Resident Glial Progenitor/Stem Cells Produce Schwann Cells as well as Oligodendrocytes during Repair of CNS Demyelination. *Cell Stem Cell*, v. 6, n. 6, p. 578–590, jun. 2010.

ZHAN, J. et al. The Cuprizone Model: Dos and Do Nots. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 843, 31 mar. 2020.

ZHANG, C. et al. 17 β -Estradiol Increases Persistent Na⁺ Current and Excitability of AVPV/PeN Kiss1 Neurons in Female Mice. *Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 4, p. 518–527, 1 abr. 2015.

ZONOUZI, M. et al. Individual Oligodendrocytes Show Bias for Inhibitory Axons in the Neocortex. *Cell Reports*, v. 27, n. 10, p. 2799- 2808.e3, jun. 2019.

ZOU, Y. et al. Structure and function of the contactin-associated protein family in myelinated axons and their relationship with nerve diseases. *Neural Regeneration Research*, v. 12, n. 9, p. 1551, 2017.

ZOUPH, L.; BOOKER, S.A.; EIGEL, D.; WERNER, C.; KIND, P.C.; SPIRES-JONES, T.L.; NEWLAND, B.; WILLIAMS, A.C. Selective vulnerability of inhibitory networks in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* , v. 141, n. 3, p. 415-429, mar. 2021.