

**EFEITOS DO PRANLUCASTE NAS ALTERAÇÕES
FISIOPATOLÓGICAS DE MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA**

ANA BEATRIZ MIRANDA DE SÁ

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF**

Campos dos Goytacazes - RJ

Junho de 2024

EFEITOS DO PRANLUCASTE NAS ALTERAÇÕES
FISIOPATOLÓGICAS DE MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE
MÚLTIPLA

ANA BEATRIZ MIRANDA DE SÁ

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Sheila Espírito Santo Araújo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ

Junho de 2024

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

S111

Sá, Ana Beatriz Miranda de.

"Efeitos do pranlucaste nas alterações fisiopatológicas de modelo animal de Esclerose Múltipla" / Ana Beatriz Miranda de Sá. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

88 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientadora: Sheila Espírito Santo Araújo.

1. Sinaptopatia. 2. Desmielinização inflamatória. 3. Excitotoxicidade. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EFEITOS DO PRANLUCASTE NAS ALTERAÇÕES FISIOPATOLÓGICAS DE
MODELO ANIMAL DE ESCLEROSE MÚLTIPLA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e
Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 22/02/2024

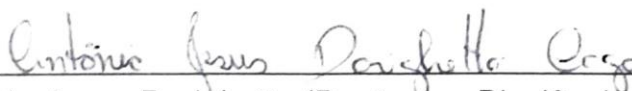
Comissão Examinadora:



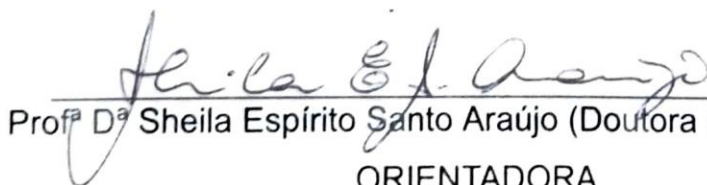
Profª Drª Juliana Vasques (Doutora em Neurociências) - UFRJ



Profª Drª Marinete Carrera (Doutora em Psicobiologia) - UENF



Prof Dr Antônio Jesus Dorighetto (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF



Profª Dª Sheila Espírito Santo Araújo (Doutora em Biofísica) - UENF

ORIENTADORA

*Que sejamos capazes de suportar o
vendaval, para desfrutarmos da calma.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por me conceder saúde, força e fé para enfrentar esta jornada desafiadora;

Expresso minha gratidão aos meus pais e ao meu irmão, cujo apoio e presença constante, mesmo à distância, sempre me impulsionaram e fortaleceram minha confiança;

Em particular, dedico um profundo agradecimento ao meu marido Yan, pelo apoio inabalável, carinho e companheirismo, que foram essenciais nos momentos em que sua presença era tudo o que eu precisava para encontrar equilíbrio e tranquilidade;

Aos meus amigos e colegas de trabalho, expresso minha gratidão pelo convívio amigável, pelas experiências compartilhadas e pelo aprendizado mútuo. Não poderia deixar de agradecer ao meu grupo de pesquisa, em especial Saulo e Carol, que foram indispensáveis em diversos momentos para o meu aprendizado, me instruindo desde o começo. Agradeço aos meus alunos de iniciação científica Maria, Ludmarry e Gabriel, pelo empenho e dedicação, e por trabalharem sempre com muito carinho. Estarei sempre torcendo pelo sucesso de vocês. Em especial, agradeço a Lícia pela amizade sincera e por sempre me lembrar de quem sou e do meu valor nos momentos mais desafiadores.

Agradeço também à minha orientadora, Sheila, pela dedicação no laboratório, pelo tempo generosamente dedicado a me ensinar com paciência, contribuindo significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Expresso minha gratidão à revisora Grazielle, que aceitou de prontidão e foi fundamental na escrita do trabalho. Por fim, agradeço à banca pelo aceite e pelas valiosas considerações que serão realizadas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. EPIDEMIOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA	15
2.2. FISIOPATOLOGIA	16
2.2.1 Desmielinização	19
2.2.2 Neuroinflamação: contribuição dos astrócitos e microglia	22
2.2.3 Sinaptopatia	25
2.2.3.1 Recaptação de glutamato	28
2.3 TRATAMENTOS	30
2.3.1 Pranlucaste	32
2.4 MODELO DE EM POR INTOXICAÇÃO POR CUPRIZONA	34
3. OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVOS	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 ANIMAIS	38
4.2 TRATAMENTOS	38
4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA	38
4.4 WESTERN BLOTTING	41
4.5 TESTE “VISUAL CLIFF”	42
4.5.1 Análises das taxas de exploração e descida	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5. RESULTADOS	44
5.1 Tratamento com PLK a 0,1mg/kg previne a disfunção visual induzida pelo modelo de EM induzido por CPZ	44
5.2 Pranlucaste à 0,1 mg/kg previne parcialmente a desmielinização em modelo de EM induzido por cuprizona	45
5.3 Pranlucaste à 0,1 mg/ kg atenua a inflamação do modelo de EM induzido por cuprizona, sem afetar a reatividade astrocitária e microglial	47
5.4 PLK atenua parcialmente as alterações sinápticas induzidas pelo modelo de EM	50
5.5 Tratamento preventivo com PLK à 0,1 mg/ kg promove aumento do transportador de glutamato no córtex visual em modelo de CPZ	53
5.6 Tratamento preventivo com PLK à 0,2 mg/ kg previne a disfunção visual, mas não modula a desmielinização e ativação astrogliar induzida pela CPZ	53
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	69
8. REFERÊNCIAS	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais terapias modificadoras da doença aprovadas para esclerose múltipla (EM).

Tabela 2. Padrão de tratamento dos grupos experimentais.

Tabela 3. Especificação dos anticorpos primários

Tabela 4. Especificação dos anticorpos secundários

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo da interação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico na esclerose múltipla (EM).

Figura 2. Expressão aumentada de GPR17 interfere na maturação de oligodendrócitos (Olig) na esclerose múltipla (EM).

Figura 3. Perfil celular ativado nas fases inflamatória e progressiva da esclerose múltipla (EM).

Figura 4. Sinaptopatia inflamatória na esclerose múltipla (EM) e encefalomielite autoimune experimental (EAE).

Figura 5. Recaptação de glutamato por astrócitos.

Figura 6. Marcação por imunofluorescência da proteína básica da mielina (MBP) no córtex visual de camundongos saudáveis.

Figura 7. Demarcação das camadas e região de interesse no córtex visual murino.

Figura 8. Aparato *Visual Cliff*.

Figura 9. Pranlucaste (PLK) reverte o comprometimento na visão de profundidade afetada no modelo de cuprizona no teste *Visual Cliff*.

Figura 10. Imunomarcção para proteína básica da mielina (MBP) é reduzida na camada IV do córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 11. Imunomarcção para 2',3'-ciclonucleotideo fosfodiesterase (CNPase) é reduzida na camada IV do córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 12. A reatividade astrogliar é aumentada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 13. A reatividade microglial é aumentada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 14. Densidade de interleucina 6 (IL-6) é regulada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 15. Densidade de sítios pós sinápticos inibitórios é aumentada na camada IV do córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona mas não no córtex como um todo.

Figura 16. Participação das subunidades GluN2A e GluN2B do receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR) no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 17. Recaptação de glutamato é modulada no córtex visual do animal

modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona.

Figura 18. A visão de profundidade é modulada no modelo de cuprizona no teste *Visual Cliff*.

Figura 19. Concentração aumentada de Pranluaste (PLK) não é capaz de modular a mielinização.

Figura 20. Concentração aumentada de Pranluaste (PLK) não é capaz de modular a astrogliose.

LISTA DE ABREVIÇÕES

AMPAR: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico

BHE: Barreira Hematoencefálica

C1q: componente 1q do complemento

CNPase: 2',3'-cicl nucleotideo fosfodiesterase

CPZ: Cuprizona

CysLT: Cisteinil Leucotrieno

CysLTR₁: Receptor de Cisteinil Leucotrieno 1

CysLTR₂: Receptor de Cisteinil Leucotrieno 2

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

EAATs: Transportadores de Aminoácidos Excitatórios

EAE: Encefalomielite Autoimune Experimental

EBV: Epstein-Barr

EM: Esclerose múltipla

EMPP: Esclerose Múltipla Progressiva Primária

EMRR: Esclerose Múltipla Remitente Recorrente

EMSP: Esclerose Múltipla Secundário Progressivo

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

GLAST: Glutamato Aspartato

GLT-1: Transportador de Glutamato 1

GLUN2A: Subunidade 2A de NMDAR

GLUN2B: Subunidade 2B de NMDAR

GPR17: Receptor Acoplado à Proteína G17

IBA-1: Molécula Adaptadora de Ligação de Cálcio Ionizado 1

IF: Imunofluorescência

IL-1 α : Interleucina 1- alfa

IL-1 β : interleucina 1- beta

IL-6: Interleucina 6

IP: intraperitoneais

LP: Lado Penhasco

LS: Lado Seguro

LTD: Depressão de Longo Prazo

LTD 4: leucotrieno D4

LTP: Potenciação de Longo Prazo

MBP: Proteína Básica da Mielina

NF κ B: Fator de Transcrição Nuclear Kappa B

NMDAR: Receptor de N-Metil-D-Aspartato

Olig: Oligodendrócitos

OPCs: Células Progenitoras de Oligodendrócitos

PLK: Pranlucaste

PSD: Densidade pós Sináptica

SB: Substância Branca

SC: Substância Cinzenta

SNC: Sistema Nervoso Central

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral

WB: *western blotting*

RESUMO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), marcada pela presença de uma sinaptopatia só reconhecida recentemente. A doença é regida pela ativação de células periféricas e residentes do SNC. Apesar de décadas de pesquisa, a EM ainda carece de tratamentos que abordem integralmente sua patologia. As opções terapêuticas atuais se concentram em fármacos imunossupressores e imunomoduladores que visam mitigar a fase inflamatória da doença. No entanto, a fase mais tardia e progressiva, marcada pela ativação glial e neurodegeneração, continua sem opções terapêuticas eficazes. O pranluaste (PLK), um anti-inflamatório usado no tratamento da asma, foi mostrado ter efeitos na remielinização, neuroproteção e modulação de vias de sinalização relacionadas à plasticidade sináptica. Entretanto, ainda se desconhece seu impacto terapêutico na EM. Dessa forma, este trabalho visa descrever os impactos do tratamento com PLK nos aspectos fisiopatológicos associados à EM, particularmente na neuroinflamação, desmielinização, alterações sinápticas e função visual. Utilizamos o modelo de EM induzido pela alimentação diária com ração suplementada com cuprizona (CPZ) (0,2%) por 5 semanas. Paralelamente, os animais foram tratados ou não com PLK (0,1 mg/kg ou 0,2 mg/kg) via intraperitoneal durante o mesmo período. Após os tratamentos, a função do córtex visual foi avaliada através do teste comportamental “*Visual cliff*” e, posteriormente, amostras do córtex visual dos animais foram processadas para imunofluorescência (IF) ou *western blotting* (WB). O comprometimento funcional do sistema visual induzido pela CPZ foi significativamente melhorado pelo tratamento com PLK a 0,1 e 0,2 mg/kg. Observamos por IF e WB que apenas o tratamento com PLK na dose de 0,1 mg/kg foi capaz de prevenir parcialmente a desmielinização induzida pela CPZ por IF e WB para proteína básica da mielina (MBP) e 2',3'-ciclonucleotideo fosfodiesterase (CNPase). Além disso, o PLK 0,1 mg/kg atenuou a inflamação induzida pela CPZ, observado pela reduzida expressão de interleucina 6 (IL-6) na IF, apesar de não alterar a reatividade microglial e astrocitária através da IF e WB para a molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA-1) e da proteína ácida fibrilar glial (GFAP), respectivamente. Ao analisar os aspectos sinápticos, notamos um aumento significativo nos sítios pós-sinápticos inibitórios (gefirina) em CPZ que não foi revertido pelo PLK 0,1 mg/kg por IF e WB. A subunidade 2A do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) não sofreu alterações nas análises de WB. Entretanto, níveis da subunidade 2B dos receptores NMDA (GluN2B) tendem a aumentar em CPZ e são reduzidos no tratamento com PLK 0,1 mg/kg, sugerindo uma possível modulação dos receptores NMDA. A expressão do transportador de glutamato (GLAST) foi positivamente regulada em CPZ, aumentando de forma ainda mais expressiva no tratamento com PLK 0,1 mg/kg. Em suma, nossos resultados sugerem que 0,1 mg/kg é a melhor concentração para uso do PLK como tratamento no modelo de intoxicação por CPZ. Esses resultados revelam um efeito promissor do PLK como agente terapêutico abrangente na EM, ao atenuar vários aspectos fundamentais da patologia, como a preservação da função visual, a prevenção da desmielinização, a redução da inflamação e a modulação das alterações sinápticas. No entanto, são necessários mais estudos para solidificar sua eficácia e compreender plenamente seus mecanismos de ação subjacentes.

Palavras-chave: Sinaptopatia. Desmielinização inflamatória. Excitotoxicidade

ABSTRACT

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system (CNS), marked by the presence of a synaptopathy that has only recently been recognized. The disease is governed by the activation of peripheral and resident CNS cells. Despite decades of research, MS still lacks treatments that fully address its pathology. Current therapeutic options focus on immunosuppressive and immunomodulatory drugs aimed at mitigating the inflammatory phase of the disease. However, the later and progressive phase, marked by glial activation and neurodegeneration, continues to lack effective therapeutic options. Pranlukast (PLK), an anti-inflammatory used in the treatment of asthma, has been shown to have effects on remyelination, neuroprotection, and modulation of signaling pathways related to synaptic plasticity. However, its therapeutic impact on MS remains unknown. Thus, this study aims to describe the impacts of PLK treatment on pathophysiological aspects associated with MS, particularly neuroinflammation, demyelination, synaptic alterations, and visual function. We used the MS model induced by daily feeding with chow supplemented with cuprizone (CPZ) (0.2%) for 5 weeks. In parallel, the animals were treated or not with PLK (0.1 mg/kg or 0.2 mg/kg) intraperitoneally during the same period. After treatments, the function of the visual cortex was assessed through the behavioral test "Visual cliff" and subsequently, visual cortex samples from the animals were processed for immunofluorescence (IF) or western blotting (WB). The functional impairment of the visual system induced by CPZ was significantly improved by treatment with PLK at 0.1 and 0.2 mg/kg. We observed by IF and WB that only the PLK treatment at a dose of 0.1 mg/kg was able to partially prevent CPZ-induced demyelination by IF and WB for myelin basic protein (MBP) and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase). Additionally, PLK 0.1 mg/kg attenuated CPZ-induced inflammation, as observed by reduced expression of interleukin 6 (IL-6) in IF, although it did not alter microglial and astrocytic reactivity through IF and WB for ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (IBA-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), respectively. Analyzing synaptic aspects, we noticed a significant increase in inhibitory postsynaptic sites (gephyrin) in CPZ that was not reversed by PLK 0.1 mg/kg by IF and WB. The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit 2A was not altered in WB analyses. However, levels of the NMDA receptor subunit 2B (GluN2B) tended to increase in CPZ and were reduced in PLK 0.1 mg/kg treatment, suggesting possible modulation of NMDA receptors. The expression of the glutamate transporter (GLAST) was positively regulated in CPZ, increasing even more significantly in PLK 0.1 mg/kg treatment. In summary, our results suggest that 0.1 mg/kg is the best concentration for using PLK as a treatment in the CPZ intoxication model. These results reveal a promising effect of PLK as a comprehensive therapeutic agent in MS, by attenuating several fundamental aspects of the pathology, such as the preservation of visual function, prevention of demyelination, reduction of inflammation, and modulation of synaptic alterations. However, further studies are needed to solidify its efficacy and fully understand its underlying mechanisms of action.

Keywords: Synaptopathy. Inflammatory demyelination. Excitotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é a principal doença neurológica incapacitante de origem não traumática que afeta jovens adultos no mundo. É uma doença imunomediada, regida pela ativação de células periféricas e residentes do sistema nervoso central (SNC), caracterizada pela inflamação, desmielinização, sinaptopatia e transecção axonal (Bierhansl *et al.*, 2022; Kobelt *et al.*, 2017).

Atualmente, não existe cura para a EM e o conjunto das alterações patológicas leva a uma drástica diminuição na qualidade de vida, resultado de uma grande variedade de manifestações clínicas, que variam de acordo com a localização das lesões (Murúa *et al.*, 2022). De forma geral, o quadro sintomático geralmente envolve deterioração sensorial, com distúrbios no sistema visual que acomete até 70% dos pacientes, comprometimento motor e cognitivo (Bellingacci *et al.*, 2021).

Visto que a EM afeta indivíduos em idade economicamente ativa, a doença gera impactos significativos no cenário econômico (Federação Internacional de Esclerose Múltipla, 2020). Os custos relativos ao tratamento da doença, seja vinculados a hospitalização ou a terapias modificadoras da doença, são significativos. Estima-se que em países de rendimento baixo e médio, as despesas variam entre US\$463,00 a US\$58.616,00 por paciente, oscilando de acordo com a abordagem médica utilizada, elevando proporcionalmente com a gravidade da doença (Dahham *et al.*, 2021).

Embora a busca por tratamentos efetivos não seja recente, são introduzidos no mercado apenas fármacos imunossupressores e imunomoduladores que mitigam a fase inflamatória da EM, não funcionando ou sendo pouco eficazes na fase progressiva e neurodegenerativa, que acaba sendo negligenciada (Faissner *et al.* 2019). Este cenário aponta a necessidade de novas estratégias terapêuticas que preencham as lacunas onde os tratamentos disponíveis são ineficientes.

Quando a doença entra em um quadro degenerativo, é improvável que os tratamentos anti-inflamatórios sejam eficientes, mas os tratamentos neuroprotetores e indutores de reparação podem ser bem-sucedidos. Um medicamento com a capacidade de favorecer o processo natural de regeneração da mielina e/ou de reduzir a deterioração dos axônios poderia contribuir para a desaceleração e atenuação do avanço da doença (Martinez e Peplow, 2020).

Neste contexto, o pranlucaste (PLK), um anti-inflamatório usado contra a asma,

emerge como uma possível estratégia terapêutica. O fármaco foi descrito por estar associado a fatores pró-remielinizantes, além de ser recentemente descrito como um inibidor de vias anti-sinaptogênicas, podendo impactar a sinaptopatia (YU *et al.*, 2005; OU *et al.*, 2016). Dessa forma, por sua posição nos três principais pilares da EM: inflamação, desmielinização e sinaptopatia, propomos o PLK como potencial regulador da EM.

A importância do presente trabalho é refletida na possibilidade de introduzir um fármaco funcional para ambas as fases da doença. Além disso, os resultados fruto deste trabalho irão contribuir para uma compreensão mais aprofundada sobre os mecanismos sinápticos envolvidos na EM.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. EPIDEMIOLOGIA DA ESCLEROSE MÚLTIPLA

Em comparação com a última análise epidemiológica feita em 2013, houve um aumento de 30% na incidência global da EM, elevando o número de pessoas afetadas pela doença para 2,8 milhões até 2020 (Walton *et al.* 2020). Apesar das diversas lacunas a respeito de sua etiologia, existem padrões inerentes à expressão da doença e sua epidemiologia. É bem característico o acometimento de pacientes em uma faixa etária economicamente ativa, entre 20 a 40 anos, com maior prevalência em mulheres, em uma proporção de 4:1. Ademais, a incidência global é mais dominante em regiões de alta latitude com predomínio na Europa, seguido pelas Américas, tendo o Sudeste Asiático e a África com menores taxas de incidência relatadas (Walton *et al.* 2020).

Diferentes fatores de risco são apontados como possíveis desencadeadores da doença através de uma interação complexa entre influências genéticas e ambientais. Apesar de não haver evidências de herança Mendeliana, o componente genético representa 30% do risco de desenvolvimento da doença. Estudos do genoma identificaram uma variedade de polimorfismos envolvendo maior suscetibilidade a EM, compreendendo genes que regulam a imunidade inata ou adaptativa, como o complexo de histocompatibilidade II e receptores de interleucinas 2 e 7 (Ahmadi *et al.*, 2020; Moutsianas *et al.*, 2015; Baecher-Allan *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a epidemiologia da EM também é regida por efeitos ambientais que influenciam não só na suscetibilidade quanto no curso da doença (Baecher-Allan *et al.*, 2018). A baixa incidência de luz ultravioleta e deficiência de vitamina D são

fortemente associados à maior propensão à EM. Este fato pode estar diretamente relacionado à maior frequência da EM em regiões de alta latitude, uma outra influência ambiental bem determinada na EM (Ostkamp *et al.*, 2021). Apesar de ainda ser obscuro a influência da incidência solar, especula-se que seja decorrente dos efeitos indutores de tolerância imunológica e imunomoduladora atribuídos à vitamina D (Yeh *et al.*, 2020).

Infecções virais também são consideradas fatores de risco cruciais para a doença e o principal candidato é o vírus Epstein-Barr (EBV), um vírus comum que infecta até 95% dos adultos (Bjornevik *et al.*, 2022). A correlação da infecção viral com a incidência de EM é apoiada fortemente pelo risco aumentado de desenvolver a doença após infecção viral. Embora não abranjam todos os casos, níveis elevados de anticorpos séricos anti-EBV e a detecção do vírus em lesões desmielinizantes, foram descritos em estudos patológicos (Bjornevik *et al.*, 2022; Bar-Or *et al.*, 2020).

Além destes, fatores de risco como o tabagismo, trabalho noturno, exposição a solventes orgânicos, obesidade em adolescentes e influência do microbioma podem contribuir. Contudo, a maioria dos estudos aponta para uma combinação entre genética e o ambiente, onde estes fatores individualmente são insuficientes para desencadear a complexa fisiopatologia da doença (Dobson e Giovannoni 2019; Dolcetti *et al.*, 2020).

2.2. FISIOPATOLOGIA

Do ponto de vista clínico, a maioria dos pacientes apresenta um início marcado por surtos inflamatórios autoimunes. Esses surtos se manifestam por meio de episódios discretos de disfunção neurológica, seguidos por períodos de remissão, os quais podem ser completos, parciais ou nulos em um curso da Esclerose Múltipla Remitente Recorrente (EMRR) (Dobson e Giovannoni 2019). Conforme a doença avança, a frequência de períodos de remissão diminui, sendo progressivamente substituída por uma deterioração da condição clínica, que evolui para uma situação de declínio contínuo, no contexto de Esclerose Múltipla Secundário Progressivo (EMSP) (Faissner *et al.*, 2019). Em uma pequena parcela dos casos, a doença pode apresentar desde o início um curso degenerativo progressivo, com ausência de episódios remissivos, caracterizando um quadro de Esclerose Múltipla Primária Progressiva (EMPP) (Baecher-Allan *et al.*, 2018).

Apesar das condições fisiopatológicas serem fortemente estudadas, e até certo

grau compreendidas, os eventos causais ainda não são elucidados (Murúa *et al.*, 2022). Alguns autores apontam para uma origem autoimune baseada na hipótese “de fora para dentro”, onde os fatores desencadeadores têm origem na imunidade inata e adaptativa, seguida por uma patogênese secundária de degradação na mielina (Luchicchi *et al.*, 2021). Em contrapartida, a hipótese “de dentro pra fora” é fundamentada na degeneração primária de oligodendrócitos (Olig) e desestabilização da mielina, iniciada previamente na fase sintomática, e uma reatividade imunológica secundária (Titus *et al.*, 2020; Stys *et al.*, 2012).

Um crescente conjunto de evidências aponta para as respostas imunes periféricas como os agentes condutores iniciais da doença, alinhando-se à hipótese de origem "de fora para dentro" (Correale *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2020). Linfócitos T e B autorreativos atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) e desencadeiam uma reação cruzada contra epítopos do SNC, mediada por uma ativação inflamatória (Klineova e Lublin, 2018; Ruiz *et al.*, 2019; Scott, 2021). Geralmente, as proteínas abundantemente expressas na mielina e Olig, como a proteína básica da mielina (MBP), a glicoproteína de Olig de mielina e a proteína proteolipídica, são os principais alvos desse ataque autoimune. Esse processo culmina na desmielinização, o que resulta em uma condução comprometida na transmissão sináptica, sinalização neural prejudicada e, em alguns casos, na perda neuronal parcial ou total (Lopez *et al.*, 2021).

A infiltração das células periféricas no sistema nervoso central pode culminar e perpetuar as lesões desmielinizantes, porém sozinhas não são capazes de explicar completamente sua dinâmica (Friese *et al.*, 2014). A interação entre os diversos grupos celulares, imunes periféricas, células astrocíticas e microgliais, para manter a inflamação e a desmielinização nas lesões da EM são esquematizados na Figura 1.

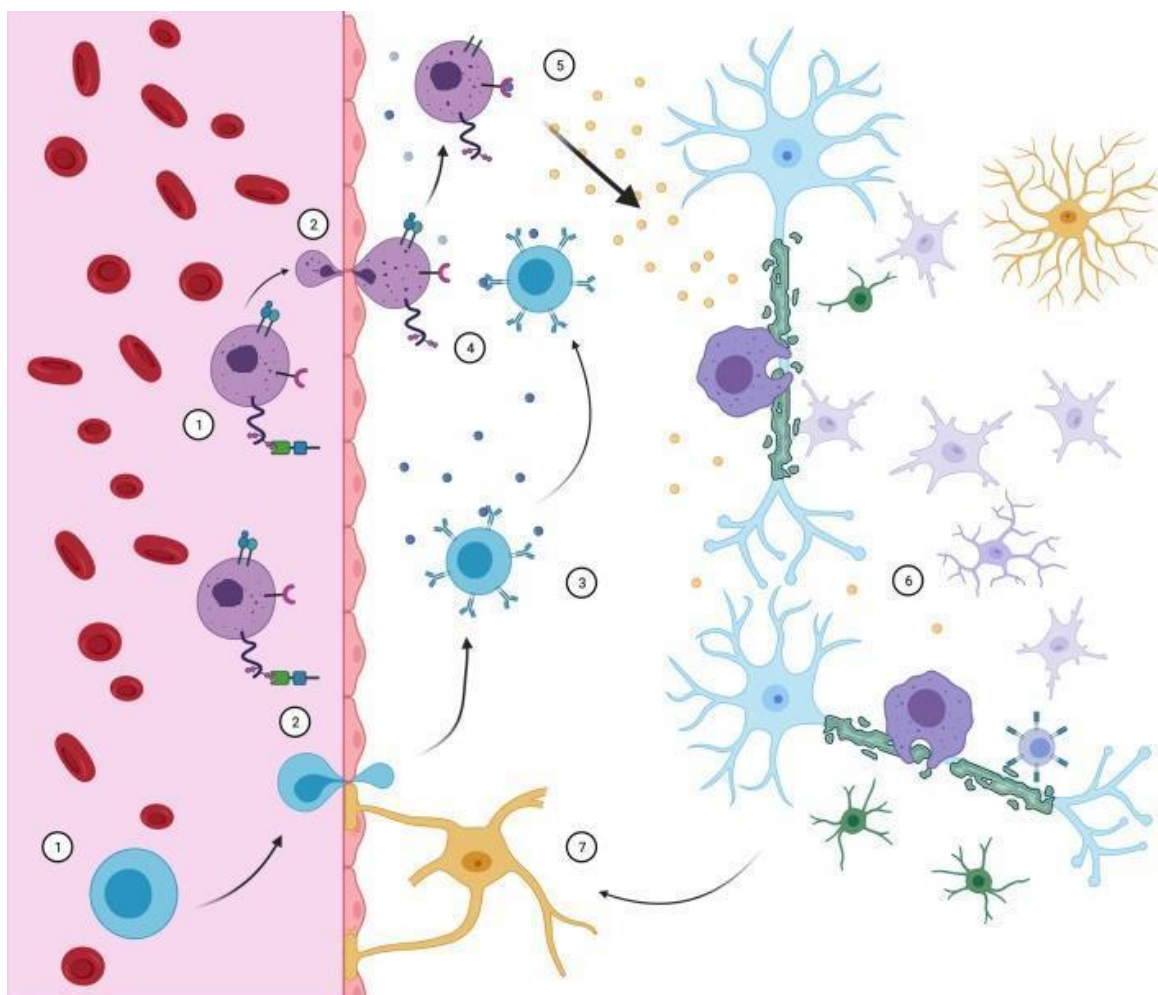


Figura 1. Esquema representativo da interação entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imunológico na esclerose múltipla (EM). (1) Células B e células Th CD4+ atravessam a BHE para entrar no SNC (2). Dentro do SNC, as células B podem entrar em contato com antígenos específicos da mielina, geralmente glicoproteína de oligodendrócitos de mielina, proteína básica da mielina (MBP) ou proteína proteolipídica (3) e apresentá-los às células Th (4), desencadeando uma resposta inflamatória (5). Isso resulta na liberação de citocinas pró-inflamatórias (5), que por sua vez recrutam micróglias residentes, macrófagos, células CD8 e astrócitos, levando ao desenvolvimento de lesões desmielinizantes (6). Enquanto isso, os precursores de Olig são incapazes de compensar a destruição da bainha de mielina. A infiltração contínua de células imunes periféricas é facilitada pela destruição adicional da BHE, associada a astrócitos reativos (7). Embora todos esses eventos contribuam para a fisiopatologia da lesão, a ordem exata e os eventos desencadeadores ainda são temas de debate. Fonte: Adaptado de Coutinho *et al.* (2023).

Durante muito tempo, acreditou-se que os danos na EM se resumiam aos danos à substância branca (SB), caracterizados pela presença de placas desmielinizantes (Friese *et al.*, 2014). Entretanto, estudos de ressonância magnética e análise *post mortem* demonstraram um conjunto de injúrias à substância cinzenta (SC), que inclui presença de lesões desmielinizantes, atrofia neuronal e número reduzido de sinapses. O comprometimento dessa região desencadeia prejuízos em regiões corticais e subcorticais, assim como desconexão dos circuitos neuronais, desmielinização

generalizada e perda neuronal (Jürgens *et al.*, 2016; Mandolesi *et al.*, 2015).

Na encefalomielite autoimune experimental (EAE), modelo animal de EM baseado na imunização contra antígenos da mielina, é relatado a atrofia e perda sináptica previamente à fase sintomática do modelo, afetando áreas de neurônios desmielinizados e não desmielinizados, de forma independente da desmielinização (Friese, 2016). Dessa forma, o processo inflamatório no SNC parece promover a desmielinização podendo ou não resultar em neurodegeneração na EAE ou na EM (Cree *et al.*, 2021; Brück, 2005).

2.2.1 Desmielinização

A hipótese mais aceita para a origem da EM tem a inflamação como um mecanismo primário e a desmielinização inflamatória é vista como o evento secundário que, por sua vez, desencadeia uma série de eventos que podem modular a gravidade da doença (Ouellette *et al.*, 2020; Morgan *et al.*, 2021).

A mielina desempenha um papel essencial para a função sináptica, condução do potencial de ação e manutenção neural. Além de auxiliar no metabolismo energético, fornece proteção física aos axônios e fatores tróficos, sendo crucial para a integridade neuronal (Simkins *et al.*, 2021). Não só a perda da bainha de mielina como a perda de Olig induz um grande dano metabólico, uma vez que os Olig são acoplados metabolicamente aos axônios e fornecem subprodutos da glicólise, contribuindo fortemente para a redução do gasto energético axonal (Dutta *et al.*, 2006; Simkins *et al.*, 2021).

A remielinização nos estágios iniciais da doença foi documentada em cérebros *post mortem* (Chang *et al.*, 2002). Mecanismos de recrutamento e maturação de células progenitoras de Olig (OPCs) são induzidos naturalmente na tentativa de restabelecer a produção de mielina e homeostase tecidual (Sun *et al.*, 2023). Entretanto, estes processos são perdidos com a cronicidade da doença, intensificação inflamatória e perda na densidade de Olig (Chang *et al.*, 2002).

O processo de maturação dos Olig para produção de células produtoras de mielina é complexo e finamente regulado por parâmetros espaço-temporais, onde os OPCs passam por diferentes estágios de diferenciação até a fase madura mielinizante (Sun *et al.*, 2023). Foram descritos níveis abundantes de OPCs e Olig pré-mielinizantes nos focos de lesão crônica na EM, onde a desmielinização é expressiva, associados a

morte intensa de oligo maduros e presença destas células remanescentes em estágio imaturo, tornando mecanismos de remielinização fortemente comprometidos (Urbanski *et al.*, 2019). Nestes locais, a mielina apresenta morfologia alterada, com múltiplos inchaços, variações acentuadas de diâmetro e curso tortuoso, o que indica um processo de remielinização incompleta e irregular (Chang *et al.*, 2002). Já nos centros de lesão aguda, o tecido apresenta desmielinização e morte oligodendroglial em andamento, somado a abundante presença de células fagocíticas reativas à mielina (Rovira *et al.*, 2013). Nestas regiões, estão presentes Olig mielinizantes residuais, onde regiões mielinizadas aparentam aspecto normal, com mielinização axonal reta e com diâmetro consistente (Chang *et al.*, 2002).

A variação no grau de comprometimento da remielinização entre os focos de lesão aguda e crônica está correlacionada com o nível de maturação dos Olig presentes. Esses dados sugerem que o mecanismo de proliferação e recrutamento dessas células na EM não é comprometido, mas sim o processo de maturação. Isso resulta na remielinização permanecendo estagnada no estágio pré-mielinizante nos focos de lesões crônicas (Hanafy e Sloane, 2011; Lloyd e Miron, 2019).

Evidências apontam que em modelos de lesões desmielinizantes, a expressão contínua do receptor acoplado à proteína G 17 (GPR17), um receptor órfão altamente expresso nas fases iniciais de diferenciação oligodendroglial, mantém as células na sua forma imatura, impedindo o processo de remielinização (Chang *et al.*, 2002; Coppi *et al.*, 2013). Portanto, a conversão dos Olig imaturos ou progenitores para fases mielinizantes é um importante fator limitante para a remielinização na EM (Dziedzic *et al.*, 2020) (Figura 2).

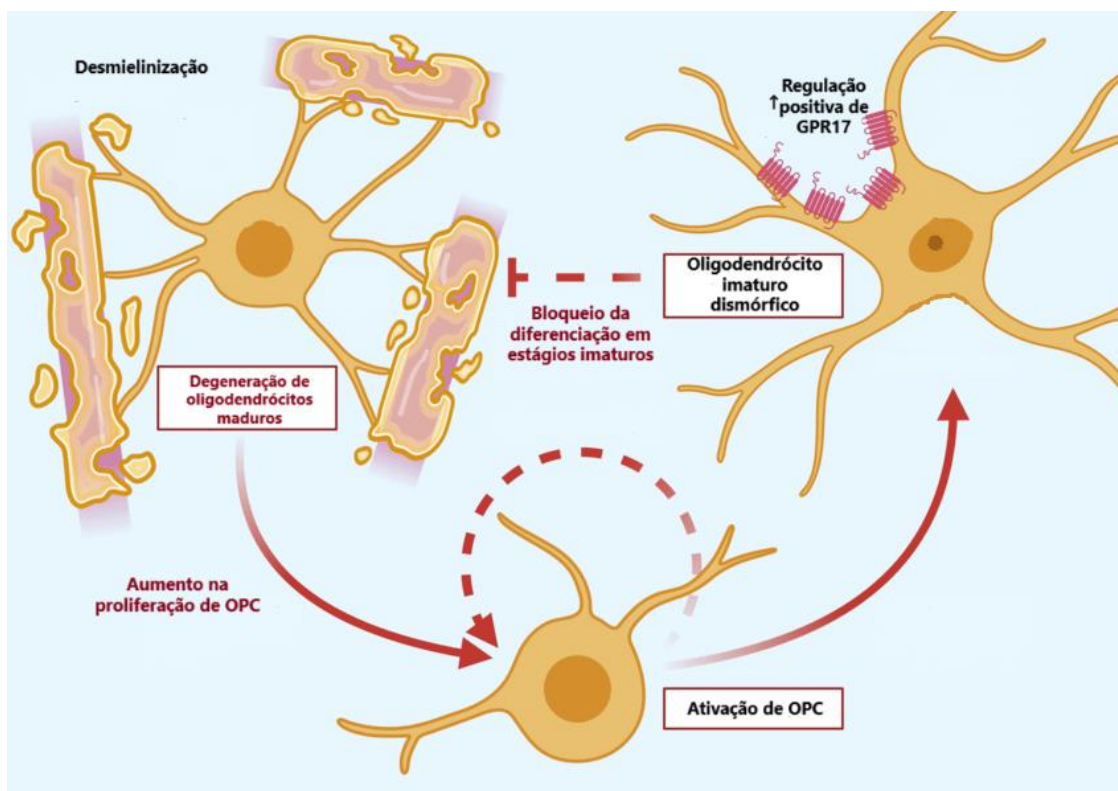


Figura 2. Expressão aumentada de GPR17 interfere na maturação de oligodendrócitos (Olig) na esclerose múltipla (EM). A expressão de GPR17 na superfície dos OPCs bloqueia sua diferenciação e maturação em Olig mielinizantes. O aumento de GPR17 pode desregular o equilíbrio entre proliferação e diferenciação dos Olig, contribuindo para a desmielinização. GPR17 pode representar um alvo terapêutico promissor para intervenções destinadas a preservar a mielinização e reduzir os danos causados pela EM. Fonte: Adaptado de Raffaele *et al.* (2021).

O resultado final da ineficiência na remielinização é o retardo ou até mesmo o bloqueio da transmissão sináptica, com ativação de uma resposta inflamatória secundária (Sun *et al.*, 2023; Simkins, *et al.* 2021). A perda de mielina contribui para a continuidade da resposta inflamatória, enquanto a inflamação persistente mantém o processo desmielinizante, afetando diretamente a sobrevivência oligodendroglial. Valentin-Torres *et al.* (2018) demonstraram que as respostas reativas de astrócitos ativados, conhecidas como astrogliose, inibem a diferenciação de OPCs, induzindo a apoptose dessas células por meio do fator de necrose tumoral (TNF- α). Essa pesquisa destaca a correlação intrincada entre desmielinização e inflamação glial. Esse ciclo interativo leva a uma progressão contínua da doença, resultando em danos neurais e sintomas cada vez mais pronunciados.

Muito se investiga a respeito dos efeitos mediados pela inflamação periférica na doença, refletindo na diversidade de terapias medicamentosas aplicáveis à fase aguda inflamatória. Entretanto os aspectos sinápticos e neurodegenerativos são menos

estudados, não havendo agentes terapêuticos capazes de conter a degeneração e comprometimento (Baecher-Allan *et al.*, 2018; Cree *et al.*, 2021). A fase progressiva na qual a neurodegeneração é prevalente, é caracterizada por uma inflamação compartimentalizada do SNC, mediada por astrócitos e microglia. Portanto, atenuar a resposta neurotóxica de astrócitos e microglia na EM deve corresponder a uma estratégia eficaz de tratamento, especialmente da fase progressiva (Coutinho *et al.*, 2023).

2.2.2 Neuroinflamação: contribuição dos astrócitos e microglia

As células gliais, a depender do microambiente, podem promover ou mitigar a neuroinflamação e deterioração neuronal (Lee *et al.*, 2022). Além disso, são um componente vital para a formação de redes sinápticas e funcionamento homeostático do SNC.

Células astro- e microgliais reativas estão presentes em todas as etapas da EM exibindo aparentemente um papel dual de fomentar mecanismos de neuroproteção e remielinização na fase aguda da doença, promover inflamação e neurotoxicidade na fase crônica (Araújo *et al.*, 2017). A glia ativada para um perfil neuroprotetor incita a remielinização contribuindo para a maturação e recrutamento de OPC, fagocitam debris de mielina que impulsionam a remielinização, secretam fatores pró-regenerativos e sinaptogênicos (Sun *et al.*, 2023). Na fase progressiva neurodegenerativa, as células gliais desempenham um papel crucial que vai além de sua função de suporte neural. A comunicação bidirecional e recíproca entre células gliais neste momento regula o grau de inflamação e neurodegeneração do sistema (Linnerbauer *et al.*, 2020) (Figura 3).

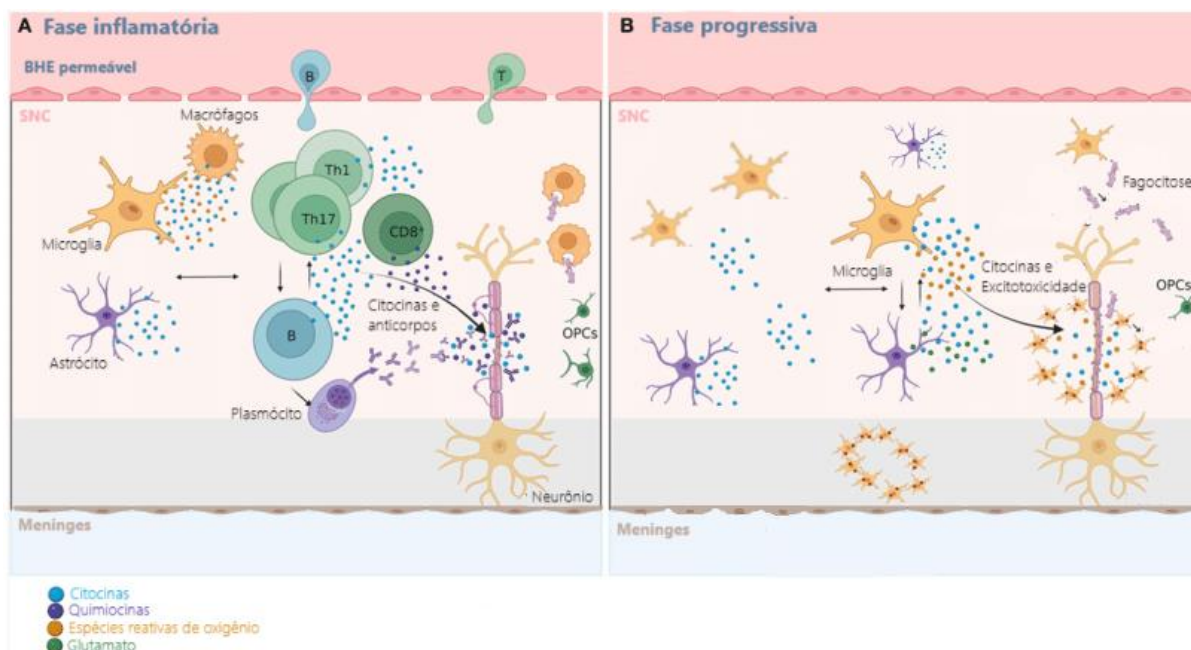


Figura 3. Perfil celular ativado nas fases inflamatória e progressiva da esclerose múltipla (EM). Esquema representativo do perfil celular ativado durante as fases inflamatória e progressiva da EM. Durante a fase inflamatória, observa-se uma predominância de células imunes, como linfócitos T e macrófagos, infiltrando o SNC, desencadeando uma resposta inflamatória exacerbada. Na fase progressiva, há uma transição para um perfil mais neurodegenerativo, com a ativação de células da glia, como astrócitos e microglias, contribuindo para a destruição axonal e perda de mielina. Fonte: Adaptado de Perdaens e Van Pesch (2022).

A microglia é a principal célula fagocítica no SNC, compondo cerca de 12% das células no SNC murino e 16% em humanos. Participam ativamente da manutenção do SNC desde estágios iniciais do desenvolvimento na indução da migração de precursores neurais e poda sináptica, promovendo a remielinização, removendo detritos, além de fornecer suporte trófico e monitoramento imunológico (Lloyd e Miron, 2019).

A microglia ativada para um perfil citotóxico diminui a expressão de marcadores anti-inflamatórios, regulando positivamente a produção de produtos promotores da inflamação, induzindo a produção de glutamato, espécies reativa de oxigênios, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ativando o sistema complemento e regulando positivamente células imunes periféricas. A aumentada expressão da proteína molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (IBA-1) é vista como um marcador de reatividade glial (Ito *et al.*, 1998). IBA-1 desempenha um papel crucial no rearranjo do citoesqueleto da microglia ativada e está envolvida na regulação da movimentação celular e fagocitose, especialmente durante condições inflamatórias como a EM e seus modelos experimentais (Abdi *et al.*, 2021; Byström *et al.*, 2014). Esse tipo de ativação,

predominante na fase neurodegenerativa e crônica da EM, contribui para a formação e perpetuação de lesões desmielinizantes e dano aos Olig (Sun *et al.*, 2023).

De modo geral, as evidências indicam que no início da EM a resposta imune da microglia é menos relevante para a inflamação (Wolf *et al.*, 2018). Durante a ativação na EM, a microglia perde a expressão de marcadores homeostáticos e super regula a expressão de genes inflamatórios. A via TREM2-APOE, associada à microglia ativada, induz processos de migração, fagocitose e metabolismo lipídico. Em consonância com esses dados, no início das lesões as células microgliais contribuem para o clearance da mielina, sendo indispensável para o processo de remielinização e reparo tecidual (Lampron *et al.*, 2015).

É digno de nota, que a microglia não opera sozinha. Existe um *crosstalk* entre microglia e astrócitos que amplificam e cronificam a patologia (Murúa *et al.*, 2022). Skripuletz *et al.* (2013) demonstraram que a ablação de astrócitos no modelo de EM induzido por cuprizona (CPZ) reduz a depuração de debris de mielina, em um mecanismo dependente de ativação microglial. Torna-se evidente que existe um mecanismo de regulação positiva que permeia a manutenção da atividade astro e microglial.

Os astrócitos são as células gliais mais numerosas no SNC, essenciais para a função e manutenção sináptica. Em condições homeostáticas, os astrócitos desempenham inúmeras funções de amparo neuronal atuando no suporte físico e trófico, recaptação de neurotransmissores na fenda sináptica, fornecimento de metabólitos, equilíbrio iônico, além de atuar como componentes da BHE e mediador neurovascular (Sun *et al.*, 2023).

Em condições inflamatórias, há o remodelamento morfológico, funcional e molecular dos astrócitos em resposta às injúrias no SNC, denominado astrogliose reativa (Linnerbauer *et al.*, 2020). Em estudos com pacientes e em modelos animais de EM, observa-se uma marcante hipertrofia dos astrócitos, os quais expressam abundantemente a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), componente do citoesqueleto astrocitário que é amplamente aumentado em contextos inflamatórios, além de sinalizadores neurotóxicos (Sun *et al.*, 2023).

Estudos indicam um papel benéfico dos astrócitos na fase inicial da EM, já que sua deleção em modelos animais da fase aguda aumenta a severidade da doença e da inflamação do SNC. Há indícios desses efeitos estarem relacionados ao seu papel

na manutenção da BHE e no recrutamento da microglia. Por outro lado, a depleção de astrócitos na fase crônica tem sido associada a melhora da doença e reduzido infiltrado inflamatório em modelo de EAE (Mayo *et al.*, 2014).

A astrogliose induzida por meio da liberação de interleucina 1- alfa (IL-1 α), TNF- α e do componente 1q do complemento (C1q) pela microglia no perfil associado à lesões crônicas interfere na capacidade astrocitária de promover sobrevivência neuronal, crescimento neurítico e sinaptogênese, ativando um perfil que induz morte neuronal e oligodendroglial (Liddelow *et al.*, 2017). Argaw *et al.* (2009) descreveram que um meio de astrócitos condicionado com TNF- α e IL-1 α , induz a permeabilização da BHE.

Foi visto que a sinalização via interleucina 6 (IL-6) astrocitária é essencial no *feedback* astrócito - microglia, e a ablação de IL-6 reduz a ativação microglial (Linnerbauer *et al.*, 2020). Ratos *knockout* para IL-6 foram resistentes à EAE, sem manifestação clínica, com reduzida migração inflamatória periférica e ausência de desmielinização (Eugster *et al.*, 1998). Níveis aumentados de IL-6 encontrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM são correlacionados com um pior curso clínico da doença. Stampanoni *et al.* (2019) relataram maior número de recidivas clínicas em pacientes com a concentração da citocina aumentada no sangue e perturbações na plasticidade sináptica.

Dessa forma, a progressão inflamatória, na presença ou não de lesões desmielinizantes, culminam em um conjunto de danos sinápticos e neuronais, progredindo para neurodegeneração.

2.2.3 Sinaptopatia

Alterações sinápticas estão sendo descritas como determinantes na neurodegeneração precoce da EM (Mandolesi *et al.*, 2015; Schwarz e Schmitz, 2023; Stampanoni *et al.*, 2017). O conjunto das alterações estruturais e funcionais que levam ao comprometimento sináptico é descrito como sinaptopatia, e envolvem uma ampla cascata de fatores decorrente do desequilíbrio de neurotransmissores em áreas corticais e subcorticais, levando a perda sináptica e potencialmente perda neuronal (Bellingacci *et al.*, 2021). Neste contexto, há a desregulação do eixo excitação/inibição em que, apesar de haver uma variação regional, sinapses excitatórias costumam ser fortemente prevalecidas em detrimento de sinapses inibitórias (Mandolesi *et al.*, 2015; Schwarz e Schmitz, 2023) (Figura 4).

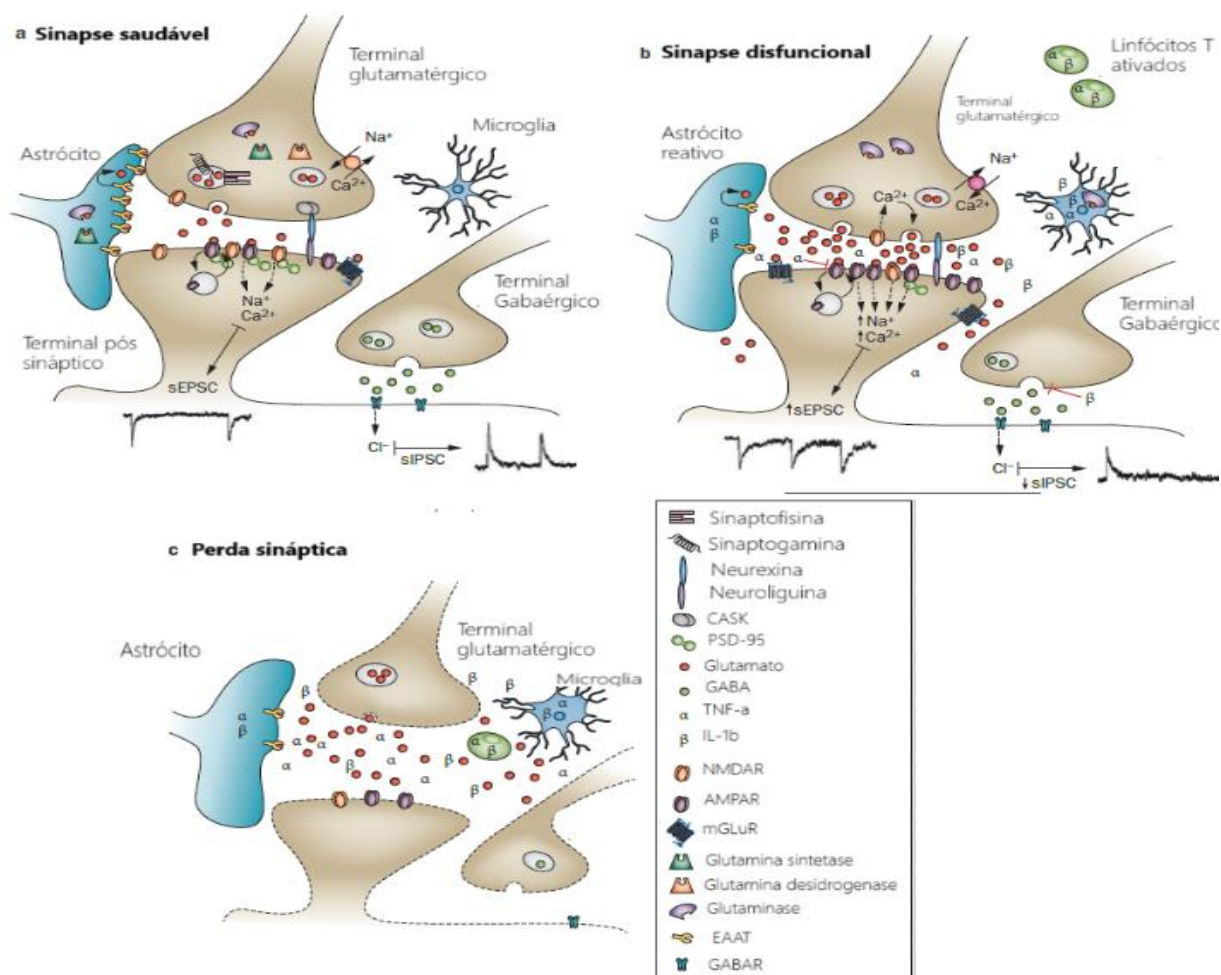


Figura 4. Sinaptopatía inflamatória na esclerose múltipla (EM) e encefalomielite autoimune experimental (EAE). Perturbações das maquinarias celulares e moleculares pré-sinápticas e pós-sinápticas podem afetar profundamente a transmissão sináptica, alterando a neurotransmissão e induzindo uma resposta mal adaptativa no microambiente do sistema nervoso central (SNC). (A) Na sinapse saudável, as concentrações de neurotransmissores excitatórios (glutamato) e inibitórios (ácido gama-aminobutírico) na fenda sináptica são moduladas por um controle estrito da liberação do transmissor, degradação ou recaptura. (B) Citocinas pró-inflamatórias liberadas por linfócitos autoreativos e microglia ativada induzem disfunção sináptica nos sistemas glutamatérgico e GABAérgico na EM e EAE. (C) Além disso, a inflamação pode induzir alterações estruturais, compreendendo perda sináptica caracterizada por degeneração do sítio pré-sináptico e/ou pós-sináptico e alterações do compartimento glial. Fonte: Adaptado de Mandolesi *et al.* (2015).

A cronicidade da ativação inflamatória e o perfil de mediadores podem alterar a transmissão sináptica e a plasticidade (Stampanoni *et al.*, 2019). Mori *et al.* (2014) relataram na EAE que o bloqueio de interleucina 1-beta (IL-1 β) diminui a transmissão inibitória, mediada pelo neurotransmissor GABA, modula a plasticidade sináptica no hipocampo. Tanto a redução inibitória quanto o fortalecimento excitatório neste contexto, levam a disfunção sináptica (Stampanoni *et al.*, 2019).

O sistema excitatório, mediado pelo neurotransmissor glutamato, é altamente prevalido na EM. A ativação contínua e prolongada dos receptores glutamatérgicos

pelo glutamato, desencadeia uma sobrecarga de Ca^{2+} intracelular, e processos que levam à morte celular, conhecido como excitotoxicidade. Tais alterações são positivamente reforçadas pela ativação inflamatória através de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e liberação de glutamato, que induzem a excitotoxicidade do glutamato e perda de redes neuronais (Mandolesi *et al.*, 2015; Schwarz e Schmitz, 2023).

Em resposta à maior liberação de glutamato, ocorre o aumento na inserção de receptores excitatórios (Musella *et al.*, 2016). Neste cenário, o aumento na desordem da sinalização e a dessensibilização dos receptores por hiperatividade é prevenida (Haroon *et al.*, 2017). O bloqueio farmacológico do receptor ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e do receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDAR) apresenta resultados positivos quanto a perda sináptica, retração dendrítica e quadro clínico da EAE, demonstrando que a ativação contínua do mesmo é fundamental para os efeitos neuronais deletérios e favoráveis à sinaptopatia (Musella *et al.*, 2016; Mandolesi *et al.*, 2015; Sulkowski *et al.*, 2014).

NMDAR são significativamente mais sensíveis às alterações nos níveis de glutamato, quando comparado a outros receptores glutamatérgicos (Boa *et al.*, 2021). Estes receptores são compostos por duas subunidades GluN1 estruturais, acoplada a duas subunidades funcionais variáveis que podem ser GluN2A-D e GluN3A-B (Paoletti *et al.*, 2021). Entre as subunidades dos NMDAR, a GluN2 é considerada a principal determinante da diversidade funcional desses receptores (Paoletti, 2013). Destacam-se a GluN2A e a GluN2B, que desempenham papéis ativos em diferentes aspectos fisiológicos e patológicos, como aprendizagem, memória e excitotoxicidade do glutamato (Schwarz e Schmitz, 2023). As subunidades GluN2 diferem entre si por inúmeros fatores, dentre eles, destaca-se a diferença na ativação e dessensibilização ao glutamato. Enquanto a GluN2A, encontrada principalmente em regiões sinápticas no SNC maduro, possui taxa de dissociação do glutamato mais rápida e favorece a eficácia da transmissão sináptica. Já ativação da GluN2B, ocorre predominantemente no SNC em desenvolvimento, em regiões adjacentes à sinapse ou extrassinápticas, exibindo uma taxa de dissociação do glutamato mais lenta. Isso contribui para a integração dos sinais provenientes de diferentes áreas do cérebro, e reduz a eficácia da transmissão sináptica (Paoletti e Neyton, 2007; Iacobucci e Popescu, 2017). Notavelmente, GluN2B exibe maior sensibilidade do glutamato comparado a GluN2A

(Bao *et al.*, 2021).

A modulação da expressão de GluN2A e GluN2B pode ser influenciada devido ao aumento de atividade e excitotoxicidade do glutamato. Como a composição dos NMDAR é altamente relevante para função do receptor, a troca das suas subunidades tem sido relatada na EM (Araújo *et al.*, 2017). O aumento nos níveis desse neurotransmissor pode comprometer os mecanismos de recaptação, levando ao extravasamento sináptico. Esse processo patológico favorece a ativação da subunidade GluN2B em regiões extrassinápticas, resultando em uma ativação prolongada do receptor. O conjunto de tais eventos contribui para uma integração sináptica prolongada e um influxo contínuo de Ca^{2+} nas células neuronais, culminando em processos neurodegenerativos (Iacobucci e Popescu, 2017; Araújo, 2014).

2.2.3.1 Recaptação de glutamato

O controle da preservação dos níveis basais de glutamato extracelular é imprescindível para minimizar possíveis ruídos sinápticos e manter uma sinalização apropriada (Tameh *et al.*, 2013). Na sinalização glutamatérgica, a ativação de AMPAR, NMDAR e sinalização Ca^{2+} dependente, é mantida incessantemente caso os níveis de glutamato extracelular se mantenham. A concentração aumentada do neurotransmissor em regiões sinápticas e extra-sinápticas leva a ativação contínua dos receptores e subsequente exposição excessiva e/ou prolongada ao glutamato, culminando em uma via indutora de morte celular, em um processo descrito como excitotoxicidade do glutamato (Mahmoud *et al.*, 2019; Dahlmanns *et al.*, 2023).

A depuração do neurotransmissor excedente do espaço extracelular é feita eficientemente pelos astrócitos, que dispõem de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) e realizam o controle da homeostase do glutamato. São conhecidas 5 isoformas de EAATs em humanos, sendo as 2 primeiras mais representativas em níveis de expressão e atividade em astrócitos. EAAT1 e EAAT2, conhecidos em murinos como transportador de glutamato aspartato (GLAST) e o transportador de glutamato 1 (GLT-1) respectivamente, são responsáveis pela depuração de 80 a 90% do glutamato total no SNC (Mahmoud *et al.*, 2019).

Nos astrócitos, o glutamato é convertido em glutamina e posteriormente liberada no espaço extracelular, onde é absorvida pelos neurônios, armazenada em vesículas no terminal pré sináptico como precursora para síntese de glutamato (Verkhratsky e

Nedergaard, 2018; Iovino *et al.*, 2020) (Fig. 5).

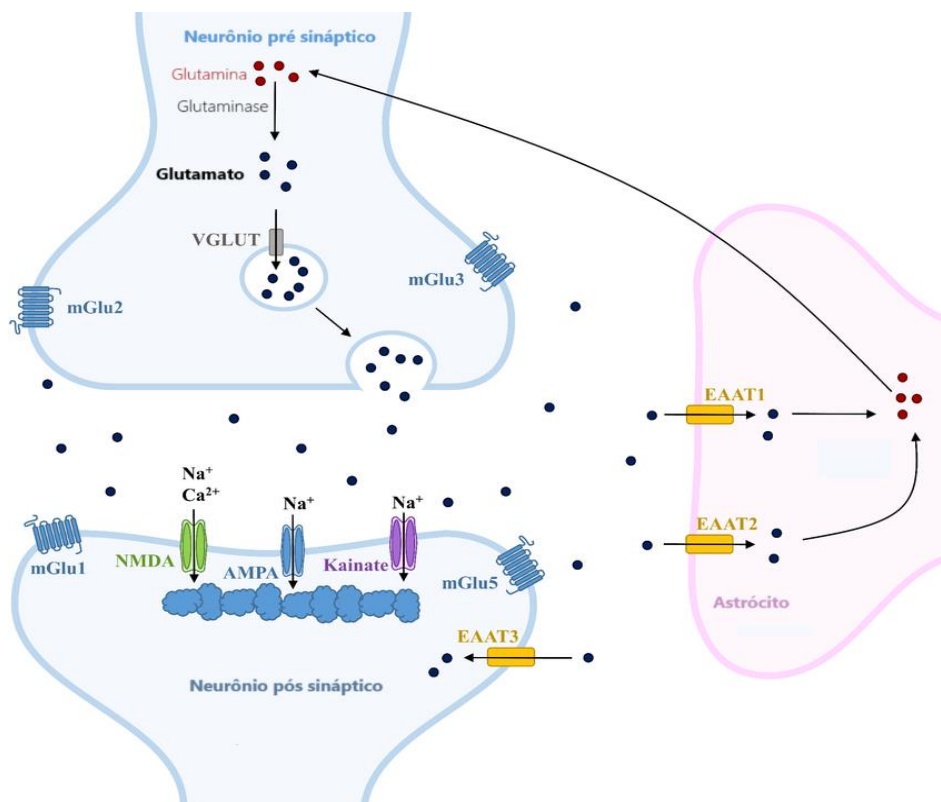


Figura 5. Recaptação de glutamato por astrócitos. Após a liberação de glutamato na fenda sináptica, os transportadores de aminoácidos excitatórios 1 (EAAT1) e o transportador de aminoácidos excitatórios 2 (EAAT2) nos astrócitos removem o neurotransmissor da fenda, convertendo-o em glutamina. Posteriormente, a glutamina é transformada novamente em glutamato nos neurônios. Fonte: Adaptado de Hristov *et al.* (2023).

Este mecanismo é desvirtuado no ambiente inflamatório, onde a presença de IL-1 β e TNF- α reduz a expressão de EAATs, limitando a recaptação de glutamato e tornando o ambiente extracelular propício para hiperexcitabilidade. A microglia ativada para um perfil citotóxico também pode exibir este perfil, contribuindo para o aumento na concentração de glutamato em resposta mediada pela influência da imunidade periférica (Schwarz e Schmitz, 2023). A contenção da inflamação permite que o mecanismo homeostático seja recuperado. Contudo, na cronicidade da EM a hiperexcitabilidade é prevaletida e o dano neural se torna progressivo (Mandolesi *et al.*, 2013).

O transbordamento de glutamato diminui a capacidade de retenção do neurotransmissor, ativando majoritariamente NMDAR extrassinápticos, que desencadeiam correntes de entradas lentas e favorecem o sincronismo de potenciais de ação (Mahmoud *et al.*, 2019; Haroon *et al.*, 2017). Em conjunto, estes fatores acarretam na atrofia e regressão de espinhas dendríticas, comprometendo a

integridade sináptica (Haroon *et al.*, 2017).

Estudos mostram que alterações sinápticas ocorrem em áreas de neurônios desmielinizados e não desmielinizados na EM, tendo mediadores inflamatórios contribuindo para a eliminação das sinapses, e de modo independente da desmielinização. Isso nos sugere uma interação direta entre inflamação e as alterações sinápticas, que não necessariamente passam pela desmielinização na doença (Mandolesi *et al.*, 2015; Jürgens *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, vários fármacos imunossupressores e imunomoduladores foram introduzidos para controlar a fase inflamatória da EM. No entanto, até o momento, nenhum tratamento abordou completamente todas as fases da doença (Healy *et al.*, 2022). Especificamente em relação à sinaptopatia, enfrentamos uma lacuna terapêutica desafiadora, que é um aspecto frequentemente negligenciado da doença. Isso ressalta a urgência de pesquisa e desenvolvimento de abordagens eficazes para preservar a integridade sináptica e mitigar os impactos durante a progressão da EM.

2.3 TRATAMENTOS

Por ser uma doença ainda sem cura, e devido a escassez de tratamentos para todas as fases da EM a maioria dos tratamentos disponíveis atuam na modulação inflamatória e contenção dos picos sintomáticos. A depender da combinação farmacológica, podem até atrasar ou até melhorar modestamente a incapacidade (Hauser e Cree, 2020). As estratégias medicamentosas de maior eficácia baseiam-se na redução da apresentação de antígenos, ou contenção da migração de linfócitos ao SNC (Hauser e Cree, 2020) (Tabela 1). Entretanto, dentre os medicamentos disponíveis para tratar a EM poucos são aqueles aplicáveis na contenção da progressão neurodegenerativa mediada pela gliose e sinaptopatia (Baecher-Allan *et al.*, 2018; Faissner *et al.* 2019).

Tabela 1. Principais terapias modificadoras da doença aprovadas para esclerose múltipla (EM).
Fonte: Adaptado de Hauser e Cree (2020).

Classe do medicamento	Nome do medicamento	Mecanismo de ação	Efeito	Fase aplicável
Anticorpo monoclonal	Ocrelizumab Ofatumumabe	Depleção seletiva de linfócitos B que expressam CD20	Reduz apresentação de antígenos; interrompe o tráfego de linfócitos para o SNC	EMRR EMSP
	Natalizumab	Inibidor da molécula de adesão integrina $\alpha 4\beta 1$ na superfície de linfócitos	Inibe a transmigração através do endotélio do SNC	EMRR
Moduladores de esfingosina 1 fosfato	Fingolimod Sipolimod Ozanimod	Sequestro de linfócitos em órgãos linfóides	Bloqueia a saída dos linfócitos de órgãos linfóides, impedindo a migração para o SNC	EMRR EMSP
Imunossupressor	Teriflunomida	Inibe a dihidroorotato desidrogenase, uma enzima envolvida na síntese da pirimidina	Inibe a proliferação de linfócitos	EMRR
Interferon (IFN) de classe I	IFN- β (Rebif, Avonex)	Regulação negativa do complexo de histocompatibilidade	Reduz citocinas pró-inflamatórias e aumenta as anti-inflamatórias; Inibe a proliferação de células T; Bloqueia o tráfego de células inflamatórias para o SNC	EMRR
Imunomodulador	Cladribina	Seu princípio ativo, o trifosfato de cladribina, se acumula dentro da célula, resultando em interrupção do metabolismo celular, danos ao DNA e subsequente apoptose	Depleção sustentada de linfócitos TCD4, TCD8 e Células B CD19	EMRR

Nosso grupo de pesquisa tem mostrado que o imunossupressor fingolimode, embora seja útil na redução da sinaptopatia, é ineficaz nos fenômenos de desmielinização/ remielinização (de Pádua, 2023 em fase de pré-publicação; Cruz, 2021 em fase de pré-publicação). Atualmente, existem 2 medicamentos em fase III de análise pelo Food and Drug Administration (FDA) para o uso nas condições progressivas da EM. O siponimod, um modulador específico dos receptores de esfingosina-1-fosfato no sistema linfático, reduzindo a migração de linfócitos para o SNC. Já o ocrelizumab, anticorpo monoclonal específico para proteína CD20 de linfócitos B, leva a sua depleção seletiva. Apesar de serem aplicáveis à fase degenerativa da EM, ambos apresentam menos de 30% de redução do risco de progressão da incapacidade (Faissner 2019; Dimitriou *et al.*, 2023). Portanto, fica claro que ainda é necessário desenvolver terapêutica com melhor eficácia. É de suma importância estudos que visem investigar novas estratégias aplicáveis para a conter a degeneração mediada pela atividade glial e progressão da doença.

2.3.1 Pranlucaste

Pranlucaste (PLK) (Onon[®], Azlaire[®]) é um inibidor da ativação do leucotrieno D4 (LTD 4) através do antagonismo competitivo seletivo do receptor de cisteinil leucotrieno 1 (CysLTR₁) em células endoteliais e principalmente em células imunes (Yokoyama *et al.*, 1998). CysLT são mediadores lipídicos bioativos que contribuem para o quadro fisiopatológico da asma e demais condições respiratórias. Inibindo a via dos CysLT, o PLK previne edema das vias aéreas, contração do músculo liso e aumento da secreção de muco, reduzindo o broncoespasmo. O medicamento é indicado para o tratamento profilático da asma brônquica crônica e rinite alérgica em pacientes pediátricos e adultos (NCBI, 2024; Keam *et al.*, 2003).

O receptor CysLTR₁ também é encontrado em células endoteliais microvasculares no cérebro. Em modelos de lesão traumática, observou-se uma expressão induzível em neurônios e células gliais (Zhang *et al.*, 2004). A ativação desse receptor está associada a várias formas de lesões cerebrais, como trauma, isquemia, tumores e na EM, onde medeia processos de excitotoxicidade e gliose (Zhang *et al.*, 2004; Zhang e Wei, 2005; Shi *et al.*, 2015; Mirshafiey e Jadidi-Niaragh, 2010).

Por outro lado, o bloqueio do receptor demonstrou diversos efeitos neuroprotetores, incluindo a redução na permeabilidade da barreira hematoencefálica, a prevenção da formação de cicatriz glial e a proteção contra eventos isquêmicos e

excitotóxicos (Yu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2022; Ding *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007). Ao antagonizar o receptor com PLK a 0,1 mg/kg, Ding *et al.* (2006) observaram a recuperação da perda da densidade neuronal, redução do volume da lesão e redução da densidade de NMDAR, em um modelo de lesão excitotóxica induzida pela microinjeção de NMDA. Paralelamente, o tratamento com PLK não apenas diminuiu a densidade do NMDAR, mas também reduziu significativamente a expressão de mRNA para o CysLTR₁. Essa regulação positiva entre o bloqueio do CysLTR₁ e a redução de NMDAR evidencia o envolvimento do receptor na excitotoxicidade.

Paralelamente, o antagonismo destes receptores foi associado a inibição de GPR17 (Chen *et al.*, 2018). Esta correlação existe, uma vez que CysLTR são filogeneticamente próximos aos receptores GPR17, sendo ativados duplamente pelos leucotrienos e por nucleotídeos de uracila. Devido ao grau de homologia, antagonistas dos CysLTR inibem a ativação de GPR17 em diferentes contextos (Chen *et al.*, 2018). Inúmeras evidências apontam para o GPR17 como possível agente impeditivo da remielinização, uma vez que o seu aumento na superfície de OPC bloqueia a diferenciação e maturação em Olig mielinizantes (Dziedzic *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2009).

Hennen *et al.* (2013) relataram melhora na maturação de Olig e aumento nos níveis de MBP de maneira dependente da inibição de GPR17 em cultura de oligodendrócito primária. Foi descrita a participação do PLK na indução da remielinização, através da inibição de GPR17 (Theron *et al.*, 2014). Assim, ao antagonizar este receptor, PLK estimula a remielinização, diferenciação a Olig maduros e sua sobrevivência (Seyedsadr e Ineichen, 2017; Ou *et al.*, 2016). Ademais, a inibição de GPR17 promove diretamente a contenção da inflamação na EM, sendo potencialmente promissor para a recuperação da mielina em análise de tecido *post mortem* e em modelos de EM (Angelini *et al.*, 2021; Lecca *et al.*, 2021).

Além dos efeitos envolvendo o antagonismo dos CysLTR₁, como a inibição de GPR17 e os efeitos nos NMDAR, PLK foi descrito como possível modulador de vias anti-sinaptogênicas. Capra *et al.* (2015) utilizando células endoteliais, constataram que um pré-tratamento com PLK preveniu o rearranjo do citoesqueleto por intermédio de Rho-A, uma proteína anti-sinaptogênica regulada positivamente na EAE (Stern *et al.*, 2021). Baer *et al.* (2009) demonstram que a inibição de Rho-A é efetiva para a diferenciação de OPC, indicando que a modulação inibitória desta proteína pode ser

benéfica para a recuperação da mielina. Manresa-Arraut *et al.* (2018) descreveram que o *knockout* de RhoA especificamente em células T reduz significativamente a incidência e gravidade da EAE, o que coincide com uma infiltração reduzida de células T.

Considerando este cenário, alguns estudos têm evidenciado o papel neuroprotetor do PLK frente a lesões do SNC e doenças neurodegenerativas como a isquemia focal cerebral e a doença de Alzheimer (YU *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2014). Porém, não há estudos que busquem observar o papel do PLK frente aos múltiplos aspectos da fisiopatologia da EM.

Deste modo, o PLK surge como uma promissora opção terapêutica ao integrar a ação anti-inflamatória através do antagonismo de CysLTR₁, inibição do receptor GPR17 e bloqueio de vias anti-sinaptogênicas. Acredita-se que a abordagem trifásica do PLK atue nos três pilares da fisiopatologia da EM, oferecendo uma perspectiva terapêutica abrangente.

2.4 MODELO DE EM POR INTOXICAÇÃO POR CUPRIZONA

É possível mimetizar aspectos da doença em modelos animais por meio de estratégias diferentes. Dentre os diferentes modelos que mimetizam a patologia da EM, os mais comumente estudados são (1) o modelo de desmielinização autoimune por EAE; (2) modelos induzidos por vírus, principalmente infecção pelo vírus da encefalomielite murina de Theiler, (3) e modelo de intoxicação por lisolecitina (Procaccini *et al.*, 2015). A maioria dos modelos investiga a participação dos linfócitos T e B no SNC. No entanto, a fisiopatologia da EM envolve a ativação de diversos grupos celulares e mecanismos, demandando modelos que possam refletir essas mudanças. Cada modelo é capaz de mimetizar marcas distintas da EM e a adoção de cada modelo em pesquisas é guiada pelo tipo de pergunta a ser respondida (Friese, 2016; Ji *et al.*, 2022).

No presente estudo, empregamos o modelo de intoxicação por CPZ, o qual induz um insulto global sem comprometer a BHE, resultando em danos em várias áreas do sistema nervoso central, incluindo desmielinização, inflamação e alterações sinápticas (Martinez e Peplow, 2020). Desta forma, o modelo de CPZ mimetiza a neuroinflamação desmielinizante da EM, muito útil para estudar mecanismos de renovação de Olig, astro- e microgliose, e sinaptopatia (Martinez e Peplow, 2020; Araújo *et al.*, 2017; Araújo, 2014).

Este contexto permite investigar de forma mais restrita o efeito de tratamentos sobre componentes residentes do SNC (Araújo *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2020; Espírito-Santo *et al.*, 2023). Dependendo da concentração, a intoxicação por CPZ pode desencadear o comprometimento de outros órgãos, principalmente o fígado, e letalidade (Palumbo e Pellegrini, 2017; Vega-Riquer *et al.*, 2019). No entanto, foi demonstrado que a concentração de 0,2% de CPZ misturado à ração moída, leva a desmielinização abrangente no encéfalo e na medula espinhal sem prejuízo a outros órgãos periféricos (Araújo *et al.*, 2017; Zhan *et al.*, 2020).

A CPZ é um quelante de cobre que tem como alvo metaloenzimas que compromete a atividade da enzima citocromo oxidase mitocondrial, dependente de cobre. Este mecanismo, diminui a fosforilação oxidativa e produz alterações degenerativas, especificamente em Oligs por mecanismos ainda não conhecidos. A deficiência de cobre gera uma falha metabólica em Olig que culmina na redução do metabolismo energético, através do dano oxidativo mitocondrial e do retículo endoplasmático (Sen *et al.*, 2021; Marena *et al.*, 2022). Olig entram em processo de apoptose por não suportarem a extensa demanda metabólica derivada da quelação de cobre, enquanto outros tipos de células não são afetados (Jhelum *et al.*, 2020; Zhan *et al.*, 2020). O resultado, é a desmielinização e ativação glial, sem alterações na permeabilidade da BHE ou infiltração de células imunes periféricas (McMurrin *et al.*, 2019) (Figura 6).

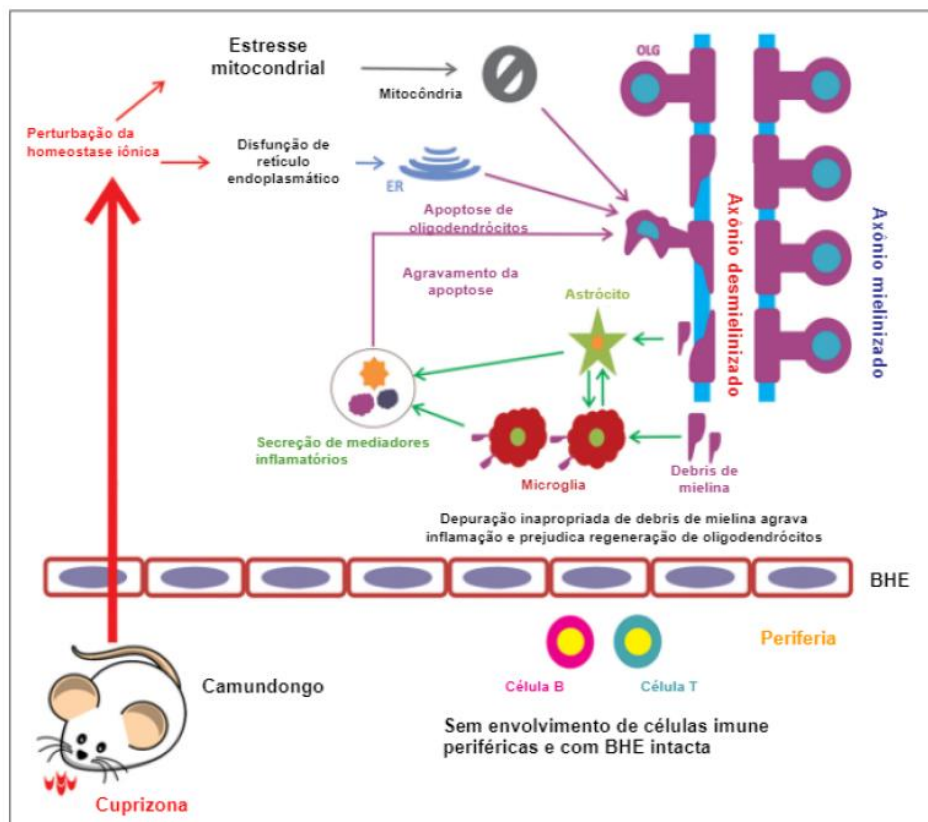


Figura 6. Desmielinização inflamatória induzida pela cuprizona. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação da intoxicação por CPZ no SNC de camundongos. A substância promove a apoptose dos oligodendrócitos (Olig), resultando em desmielinização e ativação inflamatória de astrócitos e microglia, sem provocar comprometimento da barreira hematoencefálica (BHE) ou infiltração de células periféricas. Adaptado de Sen *et al.*, 2019.

Nosso grupo tem se dedicado aos estudos dos mecanismos fisiopatológicos da doença no sistema visual utilizando o modelo de intoxicação por CPZ (Araújo *et al.*, 2017; Espírito Santo *et al.*, 2021; Espírito Santo *et al.*, 2023). Mais recentemente, trabalhos do grupo avaliam possíveis terapias para o tratamento da EM e seus mecanismos de ação no córtex visual, uma região fortemente comprometida na EM (de Pádua, 2023 em fase de pré-publicação; Cruz, 2023 em fase de pré-publicação). Considerando a carência de tratamentos eficazes para a EM, uma intervenção farmacológica eficaz em todos os aspectos fundamentais da doença o torna uma estratégia terapêutica altamente promissora.

Os efeitos do PLK são amplamente documentados em linfócitos e outras células imunológicas periféricas, devido ao seu uso clínico estabelecido (Yokoyama *et al.*, 1998). No entanto, seus efeitos no SNC são menos conhecidos, assim sua influência na patologia da EM e impacto nas células gliais ainda não foram elucidados. Portanto, acreditamos que este estudo pode fornecer *insights* significativos sobre como um

medicamento originalmente destinado ao tratamento da asma pode afetar diretamente as alterações fisiopatológicas em um modelo de EM.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Descrever os impactos do tratamento com pranlucaste nos aspectos fisiopatológicos associados à EM no córtex visual do modelo de cuprizona.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o comportamento visual de animais modelo de EM submetido ao tratamento com PLK nas doses de 0,1 e/ou 0,2 mg/kg;
- II. Investigar a desmielinização através da expressão de MBP e CNPase em animais modelo de EM após tratamento com PLK nas doses de 0,1 e/ou 0,2 mg/kg;
- III. Estudar a neuroinflamação acessando a expressão de Iba-1, GFAP e IL-6 em animais modelo de EM submetido ao tratamento com PLK nas doses de 0,1 e/ou 0,2 mg/kg;
- IV. Analisar as alterações sinápticas acessando a densidade de sítios sinápticos inibitórios (expressão gefirina) e as subunidades de NMDAR (expressão de GluN2A e GluN2B) em animais modelo de EM submetidos ao tratamento com PLK nas doses de 0,1 e/ou 0,2 mg/kg;
- V. Examinar a expressão dos transportadores de glutamato em animais modelo de EM submetidos ao tratamento com PLK na dose de 0,1 mg/Kg.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Camundongos machos suíços (*Mus musculus*) de 5 a 6 semanas de vida foram mantidos por 5 semanas no biotério experimental do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) da UENF, mantidos num ciclo de luz artificial de 12 horas/12 horas a uma temperatura ambiente controlada com irrestrito acesso a ração e água. Todos os procedimentos com animais estão de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Cuidados Animais (CEUA-UENF), sob o número de protocolo 506.

4.2 TRATAMENTOS

Para implementação do modelo de desmielinização inflamatória induzida por cuprizona que mimetiza aspectos fisiopatológicos da EM, os animais foram alimentados com ração comercial moída suplementada com 0,2% de CPZ (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, 776920) por 5 semanas (Matsushima e Morell, 2001). Animais controle receberam exclusivamente a ração comercial moída. Paralelamente, animais que receberam ração com CPZ foram tratados com injeções intraperitoneais (IP) diárias de salina ou de PLK (Cayman 10008319) na dosagem de 0,1 ou 0,2 mg/kg. Dessa forma, o tratamento foi dividido em três grupos experimentais como indicado na Tabela 2.

Tabela 2: Padrão de tratamento dos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Alimentação	Injeção
Controle (CTL)	Ração comercial moída	Solução salina
Cuprizona (CPZ)	Ração comercial moída + 0,2% Cpz	Solução salina
Pranlucaste (PLK)	Ração comercial moída + 0,2% Cpz	Plk (0,1 ou 0,2 mg/kg) diluído em salina

4.3 IMUNOFLOURESCÊNCIA

Após o 35º dia de tratamento, os animais foram submetidos à eutanásia mediante

uma sobredosagem da combinação de ketamina/xilasina (na proporção de 1:1 p/v e 75% p/v, respectivamente), administrada por via intraperitoneal. Durante o procedimento anestésico, os animais foram submetidos à perfusão intracardíaca com solução fixadora (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e 4% de paraformaldeído), conduzida por um período de 20 minutos em bomba de perfusão (Masterflex 7554-80). A taxa de infusão foi ajustada para simular a pulsação, assegurando que o fixador penetrasse de maneira suave e constante nos tecidos cerebrais. Ao fim do processo, os animais foram decapitados, e o tecido cerebral foi separado das meninges e submersos em solução fixadora *overnight* para completar o processo de fixação. No dia seguinte, os tecidos foram crioprotetidos com solução de sacarose (20%). Após, os cérebros foram incluídos em meio de congelamento (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura, #4583) e congelados com nitrogênio líquido por 5 minutos. Posteriormente, seções de 14 µm do córtex visual foram obtidas em criomicrotomo (Leica CM1860) montados em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas a -20°C até que fossem utilizadas.

Para imunofluorescência, as fatias foram submetidas a três lavagens com PBS 1X (salina tamponada com fosfato 1x 0,1M, pH 7,1) 3 vezes por 5 minutos e submetidas a recuperação antigênica específica para o tipo de marcação. Posteriormente, as fatias foram incubadas em solução de bloqueio de sítios inespecíficos (3% de Albumina de Soro Bovino, 5% de Soro Normal de Cabra e 0,2% de Triton X-100) diluídos em PBS 1X por 2 horas. Os cortes foram incubados *overnight* com os anticorpos primários (Tabela 3) diluídos em solução de bloqueio a aproximadamente 4°C em câmara úmida. No dia seguinte, os tecidos foram lavados com PBS 1X, as fatias foram incubadas por mais 2 horas com os anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluor (Tabela 4) diluídos em solução de bloqueio. Terminando esse período, as fatias foram lavadas por imersão com PBS 1X, as lâminas foram fechadas com *ProLong Gold* conjugado com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (ThermoFisher, P36931). As lâminas foram mantidas no escuro em temperatura ambiente para completa secagem. As observações e captura das imagens se deram nas camadas I a V do córtex visual e isoladamente na camada IV do córtex visual (Fig. 7), utilizando microscópio de fluorescência (Zeiss germany axioplan).

Para cada fatia cerebral foram capturados 3 campos, considerando os valores médios entre os campos. O processamento e quantificação das imagens foram feitos com o software FIJI (Image J) e os parâmetros quantificados para cada marcação

foram: a densidade integrada de marcação (IntDen), que corresponde à intensidade de marcação por área marcada; e a fração de área marcada (% Área), correspondendo a razão área marcada/área total.

Tabela 3. Especificação dos anticorpos primários

Anticorpo primário	Diluição WB	Diluição IF	Recuperação antigênica	Origem	Empresa
α - β actina	1 : 700	-	-	mouse	Sigma (A 5441)
α -CNPase	1:500	-	-	mouse	Sigma (C 5922)
α -GAPDH	1 : 1000	-	-	mouse	Sigma (Mai-16757)
α - Geferina	1 : 300	1 : 50	Tampão citrato	mouse	Santa Cruz (Sc-25311)
α -GFAP	1:500	1 : 350	Tampão citrato	rabbit	Sigma (G 9269)
α -GLAST	1:5000	-	-	goat	Sigma (Sab2502157)
α -GLT-1	1:500	-	-	rabbit	Sigma (Sab2104141)
α -IBA-1	-	1 : 100	Tampão citrato	rabbit	Fujifilm (019-19741)
α -IL-6	-	1:30	Tampão citrato	rat	Thermo Fisher (Amc0864)
α -MBP	-	1 : 200	Tampão citrato	chicken	Aves Lab (Ab_2313550)
α - GluN2A	1 : 500	-	-	rabbit	Merck (07-632)
α -GluN2B	-	1 : 250	Pepsina	rabbit	Merck (Ab1557p)

Tabela 4. Especificação dos anticorpos secundários

Anticorpo Secundário	Diluição WB	Diluição IF	Empresa
Alexa fluor 488 α - chicken	-	1 : 400	-
Alexa fluor 546 α - mouse	-	1 : 1000	Invitrogen (A 11003)
Alexa fluor 488 α - rabbit	-	1 : 400	Invitrogen (A 11034)

Alexa fluor 546 α - rabbit	-	1 : 1000	Invitrogen (A 10040)
Alexa fluor 546 α - rat	-	1 : 1000	Invitrogen (A 11081)
IRDye 680 LT α - rabbit	1:20.000	-	Li-cor (926-68021)
IRDye 800 CW α - rabbit	1:20.000	-	Li-cor (926-32211)
IRDye 800 CW α - mouse	1:20.000	-	Li-cor (926-32212)
IRDye 680 LT α - mouse	1:20.000	-	Li-cor (926-68020)
IRDye 680 LT α - goat	1:20.000	-	Li-cor (926-68024)
IRDye 800 CW α - goat	1:20.000	-	Li-cor (926-32214)

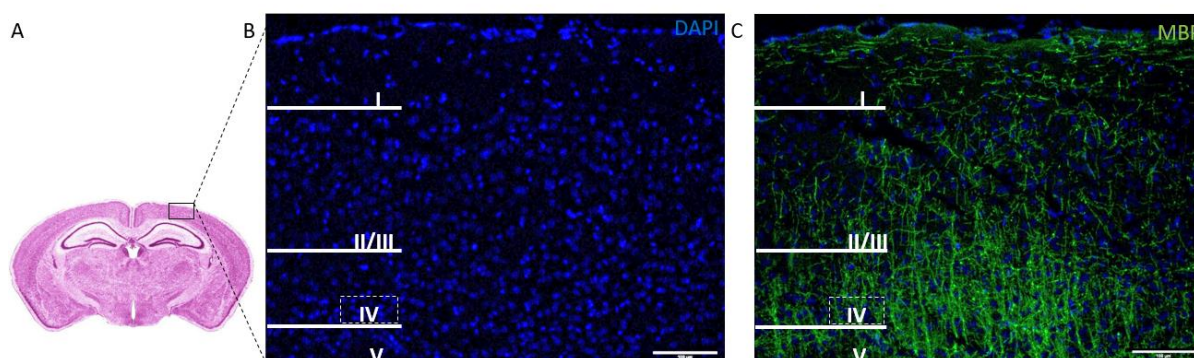


Figura 7. Demarcação das camadas e região de interesse no córtex visual murino. (A) Imagem de corte coronal de encéfalo de camundongo corado por coloração de Nissl. Retângulo preto indica a região de interesse para o nosso trabalho (córtex visual). (A) Marcação dos núcleos com DAPI para delimitação das camadas. (B) Ampliação do córtex visual evidenciando as distintas camadas corticais, de I a V. Retângulo pontilhado evidencia a camada IV, onde realizamos nossas análises em maior aumento. Núcleos marcados em azul por coloração com DAPI. (C) Marcação para MBP evidencia que as camadas mais profundas do córtex correspondem à região de maior mielinização. Retângulo pontilhado evidencia a camada IV, onde realizamos nossas análises em maior aumento. Aumento de 10x.

4.4 WESTERN BLOTTING

Ao findar os 35 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados por exposição ao dióxido de carbono (CO₂). Os córtices visuais foram extraídos e macerados a 0°C em 100µL em tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,5% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 1% Triton X 100), adicionado a um coquetel de inibidores de proteases (mini coquetel inibidor de proteases, Roche, 11836170001) e inibidor de fosfatases (1mM ortovanadato de sódio, Merck, 450243). As amostras foram dosadas

com o kit de ensaio de proteína Pierce™ BCA (ThermoFisher, 23225) e ajustadas com tampão de lise para a concentração final de 2µg de proteína/µL. Tampão Laemmli (277,8 mM Tris HCl pH 6,8, 44,4% glicerol (v/v), 4,4% SDS, 0,02% bromophenol blue) com β-mercaptoetanol na proporção 1:10 foi adicionado às amostras, que foram então fervidas por 5 minutos e então armazenadas a -20°C para posterior utilização.

O volume de 20µL de amostra foram aplicadas a cada raia do gel SDS/PAGE, submetidas à eletroforese sob corrida contínua a 80 V por gel (BioRad PowerPack 1000). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Amersham™ Hybond®) com amperagem fixa de 60 mA durante 90 minutos (PowerPac™ HC, Biorad). A eficácia da transferência foi observada através da revelação das proteínas na membrana feita com o vermelho de Ponceau (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% ácido acético glacial, diluído em água Milli-q).

Posteriormente, realizou-se incubação da membrana com solução de bloqueio (leite em pó desnatado Molico a 5%) diluído em TBS-T (20 mM Tris, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) por 2 horas a fim de bloquear os sítios inespecíficos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários (Tabela 3) diluídos em solução de bloqueio. No dia seguinte, a membrana foi lavada com TBS-T e incubada por 60 minutos com o anticorpo secundário (Tabela 4). Após a incubação, a membrana foi lavada com TBS-T para posterior revelação em sistema Odyssey XF (Licor). Após a revelação, as imagens foram obtidas no Software Li-cor e analisadas no software FIJI (Image J) para análise de densidade óptica das bandas.

4.5 TESTE “VISUAL CLIFF”

Após cinco semanas de tratamento, os camundongos foram submetidos ao teste *Visual Cliff* de forma adaptada ao que foi escrito por Walk *et al.* (1957). O teste comportamental visa avaliar o discernimento da visão de profundidade nos animais submetidos ao tratamento (Tzameret *et al.*, 2019; Fox, 1965). Neste contexto, os camundongos foram posicionados em um sistema que reproduz a aparência de um penhasco (Fig 8). O aparato é composto por uma caixa de vidro (medidas na Fig. 8), com uma placa do mesmo material (3mm) encaixada na parte superior, servindo como “tampa”. A superfície conta com uma plataforma de vidro (5 cm altura) centralizada, coberta por um adesivo preto, que divide o aparato em duas partes iguais. Em um dos lados, a placa de vidro está coberta com um adesivo quadriculado (1x1 polegada) que

fornece pistas ambientais indicando que a superfície é segura, denominado lado seguro do aparato (LS). O outro lado simula uma queda íngreme ilusória, denominado “lado penhasco” (LP), onde a parte inferior (60 cm de altura) é decorada com o mesmo adesivo quadriculado, fornecendo sinais visuais distintos de profundidade, enquanto a tampa de vidro que recobre este lado fica descoberta. Para reduzir possíveis ruídos visuais, uma placa de MDF envolveu a parte superior do aparato.

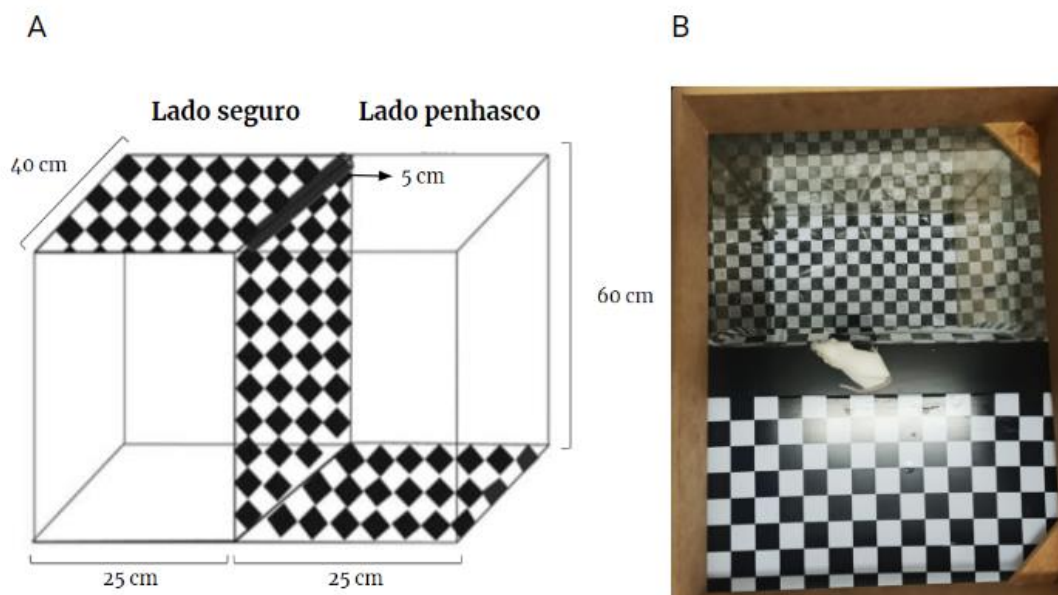


Figura 8. Aparato visual cliff. (A) Esquema representativo do aparato com visão da parte lateral e superior do aparato, com descrição das medidas e identificação dos lados. (B) Vista superior do aparato utilizado com camundongo posicionado na plataforma central e envolvido com placa de MDF.

Em ambiente controlado, cada camundongo individualmente foi colocado na plataforma central sob observação e gravação. Ao descer da plataforma, o animal era retirado, o aparato limpo com álcool para retirar quaisquer pistas olfativas, sendo devolvido para a plataforma central. Este processo foi repetido durante 5 minutos para todos os animais.

Tradicionalmente, o critério de avaliação é fundamentado no número de descidas para um dos lados S ou P (Fox, 1965). Aqui, utilizamos adicionalmente o critério de exploração como forma complementar a avaliação da interação do animal com os lados do aparato, analisando o comportamento dos roedores em se afastar ou se interessar pela área profunda, também sendo um forte indicador do comprometimento visual.

4.5.1 Análises das taxas de exploração e descida

As gravações foram avaliadas para análise dos parâmetros de exploração e

número de descida para cada lado. Foi considerado descida quando todas as patas do camundongo estavam em um dos lados S ou P, completamente fora da plataforma central. A cada vez que o evento se repetia, era considerado 1 ponto. O critério para análise da exploração foi baseado no movimento da cabeça do animal em direção a cada lado. Foi avaliado com 0,5 pontos todas as vezes que o animal explorou de forma rápida e avaliado com 1 ponto todas as vezes que o animal explorou de forma mais demorada e ou se inclinava para um dos lados. Como forma de reduzir a subjetividade da análise, apenas uma pessoa ficou responsável por analisar os dados do teste comportamental.

A taxa de descida foi obtida a partir do número de descidas para cada lado, pelo número de descidas totais. Esse protocolo também foi utilizado para obter a taxa de exploração. Os valores foram plotados no prisma e analisados estatisticamente de forma igual às outras metodologias.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram feitas no software GraphPad Prism 9 (Prism Software, Irvine, CA, USA) onde a variância dos dados entre os grupos experimentais foi analisada com o teste OneWay ANOVA e post-teste Tukey de múltiplas comparações. O teste-t de Student foi utilizado para realizar a análise entre os dados do mesmo grupo. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão e as diferenças significativas foram consideradas quando * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

5. RESULTADOS

5.1 Tratamento com PLK a 0,1mg/kg previne a disfunção visual induzida pelo modelo de EM induzido por CPZ

Disfunções visuais estão entre as manifestações clínicas mais comuns em pacientes com EM, atingindo cerca de 80% dos casos em algum grau durante o curso da doença. O comprometimento de vias aferentes, envolvidas no processamento da informação visual, são altamente prevalentes (Balcer *et al.* 2000; Araújo *et al.*, 2017). Assim, investigamos indícios de comprometimento na visão de profundidade dos animais com e sem a presença do PLK, pelo teste "Visual Cliff".

Como esperado, animais CTL com a função do córtex visual normal desceram significativamente mais o LS, assim como exploraram mais este lado ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$) (Fig. 9 A e B). Por outro lado, animais CPZ não exibiram preferência, de forma similar para os dois lados ($p = 0,5700$), apesar de explorar mais o LS ($p = 0,0434$). Além disso, comparado com o CTL, o grupo CPZ desceu e explorou com mais frequência o LP ($p = 0,0449$ e $p = 0,0030$ respectivamente), refletindo o comprometimento na visão de profundidade. O grupo PLK, por sua vez, exibiu taxas de descida e exploração dos lados S e P similares às do CTL, voltado para o LS ($p = 0,8781$ e $p = 0,4634$, respectivamente). Ainda, animais do grupo PLK desceram e exploraram mais o LS quando comparados ao grupo CPZ ($p = 0,0338$ e $p = 0,0052$ respectivamente), indicando a eficácia do medicamento em prevenir disfunções na visão de profundidade no modelo de EM.

Em resumo, os animais tratados com PLK exibiram um comportamento exploratório e de descida no teste do Visual Cliff semelhante ao grupo CTL. Por outro lado, o grupo tratado com CPZ demonstrou um comportamento exploratório e de descida oposto.

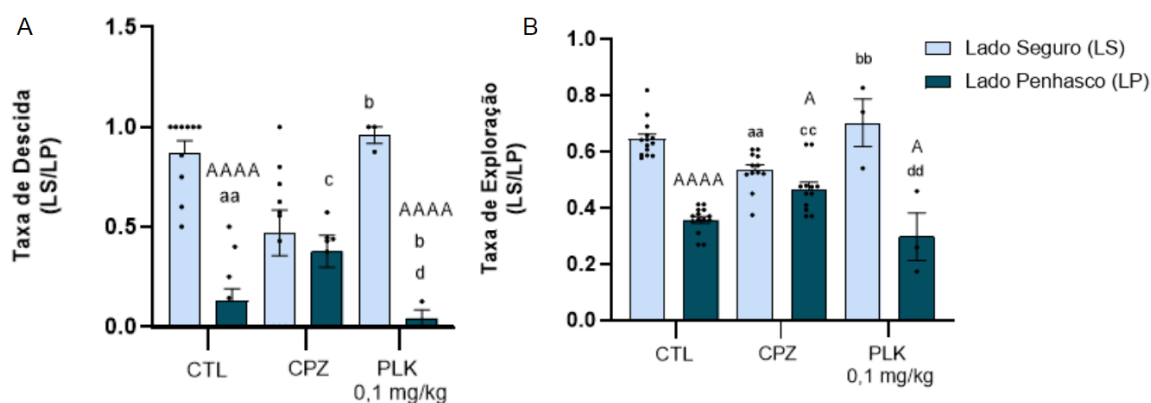


Figura 9. PLK reverte o comprometimento na visão de profundidade afetada no modelo de cuprizona no teste Visual Cliff. (A) Taxa de descida para o lado seguro (LS) e lado penhasco (LP) de animais dos grupos experimentais CTL, CPZ e PLK 0,1 mg/kg, comparativamente de forma intra e intergrupos. Taxa obtida do total de descidas para o LS ou LP pelo total de descidas. (B) Taxa de exploração do LS e LP de animais submetidos ao teste comportamental. Taxa obtida a partir do tempo de exploração do LS ou LP pelo tempo de exploração total. Comparação intragrupo: A; onde A $p < 0,05$, AA, $p < 0,01$; AAA, $p < 0,001$; (média \pm SEM, teste-t para análises intragrupo). Comparações intergrupos: CTL LS (a), CPZ LS (b), CTL LP (c), CPZ LP (d); onde a, b, c $p < 0,05$, aa, bb, cc $p < 0,01$, aaa, bbb $p < 0,001$; (média \pm SEM, one way-ANOVA, pós teste Tukey).

5.2 Pranluaste à 0,1 mg/kg previne parcialmente a desmielinização em modelo de EM induzido por cuprizona

Para além dos efeitos comportamentais visuais, buscamos avaliar os marcadores moleculares fisiopatológicos do modelo, no córtex visual dos animais, com e sem a presença do PLK.

As vias visuais são altamente mielinizadas e particularmente suscetíveis a desmielinização (Sekyi *et al.*, 2021). A fim de aferir a desmielinização induzida por CPZ nos nossos experimentos e avaliar o efeito do PLK neste aspecto, foi realizada a IF para MBP (Fig. 10). Como descrito na literatura (Purves *et al.*, 2010), animais CTL exibem uma diferença na densidade de fibras mielinizadas entre as camadas corticais, sendo as mais internas correspondentes às regiões de maior mielinização (Fig. 10 A). Embora haja uma redução qualitativa da imunomarcagem para MBP no córtex visual do grupo CPZ e uma discreta prevenção dessa perda nos animais PLK (0,1 mg/kg), a análise da densidade global das camadas não revelou essa diferença ($p=0,1876$) (Fig. 10 B). Contudo, a avaliação da camada IV, com expressiva mielinização no CTL, apresentou intensa redução de MBP no grupo CPZ, sendo essa redução atenuada nos animais PLK ($p = 0,0096$) (Fig. 10 C).

Considerando que as camadas mais profundas do córtex visual (IV e V) apresentam alterações mais expressivas, optamos por investigar os efeitos do tratamento especificamente na camada IV.

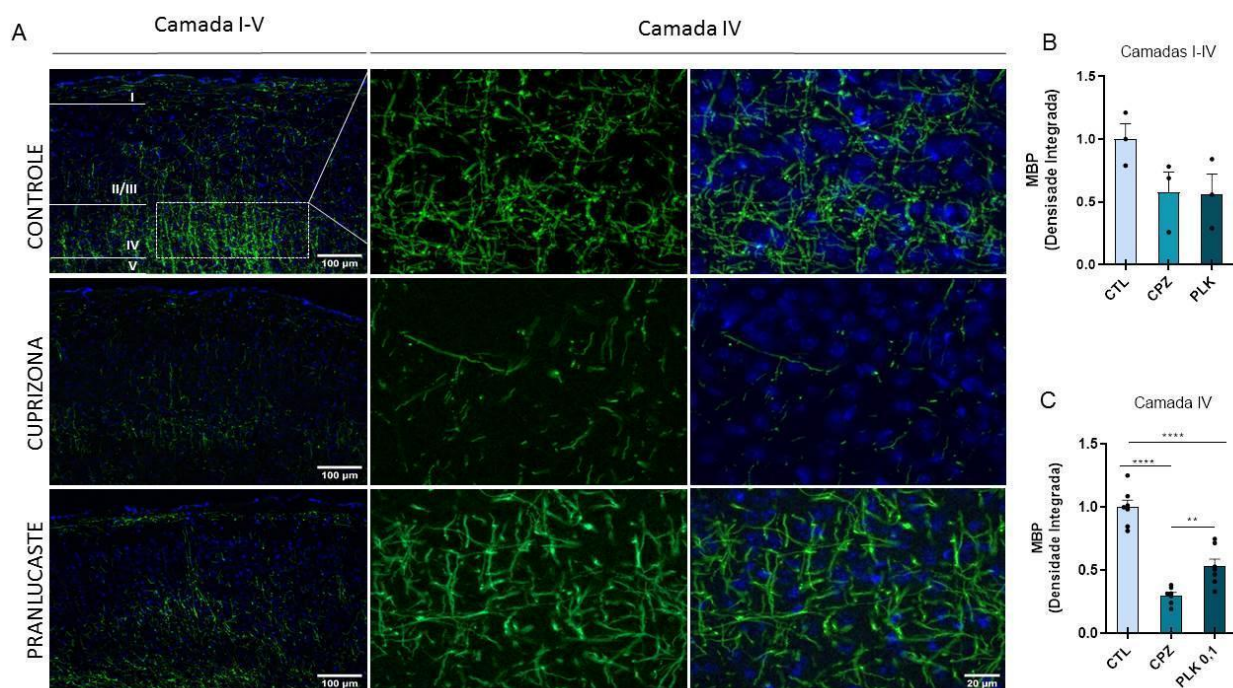


Figura 10. Imunomarcção de MBP é reduzida na camada IV do córtex visual do animal modelo de EM induzido por cuprizona. (A) Imunofluorescência para MBP a partir de fatias do córtex visual contendo as camadas celulares de I a V ou apenas a camada IV (retratada pelo retângulo branco) a partir de animais alimentados com ração controle (CTL), ração suplementada com cuprizona a 0,25% (CPZ) ou alimentados com CPZ e tratados com pranlucaste 0,1 mg/ kg (PLK). Marcação dos núcleos com DAPI. (B) Quantificação da densidade integrada de marcação de MBP das camadas I a V. Aumento de 100x. (C) Quantificação da densidade integrada de marcação de MBP da camada IV. Aumento de 400x. (média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 100 μm Camadas I-V ou 20 μm Camada IV).

Resultado semelhante é refletido pela marcação para CNPase, enzima presente na mielina e em oligodendrócitos, importante para a maturação e desenvolvimento deste grupo celular (Baburina *et al.*, 2013). Tanto a imunomarcção para CNPase na camada IV do córtex visual (Fig. 11 A e B), quanto o seu conteúdo analisado por WB a partir do córtex visual total é significativamente reduzida no grupo CPZ comparada ao CTL (Fig. 11 C e D) ($p = 0,0099$ e $p = 0,0012$ respectivamente). Por outro lado, o tratamento com PLK (0,1 mg/ kg) foi capaz de prevenir a redução da expressão da CNPase (IF e WB) vista no grupo CPZ, assim como observado para MBP ($p = 0,0472$ e $p = 0,0499$).

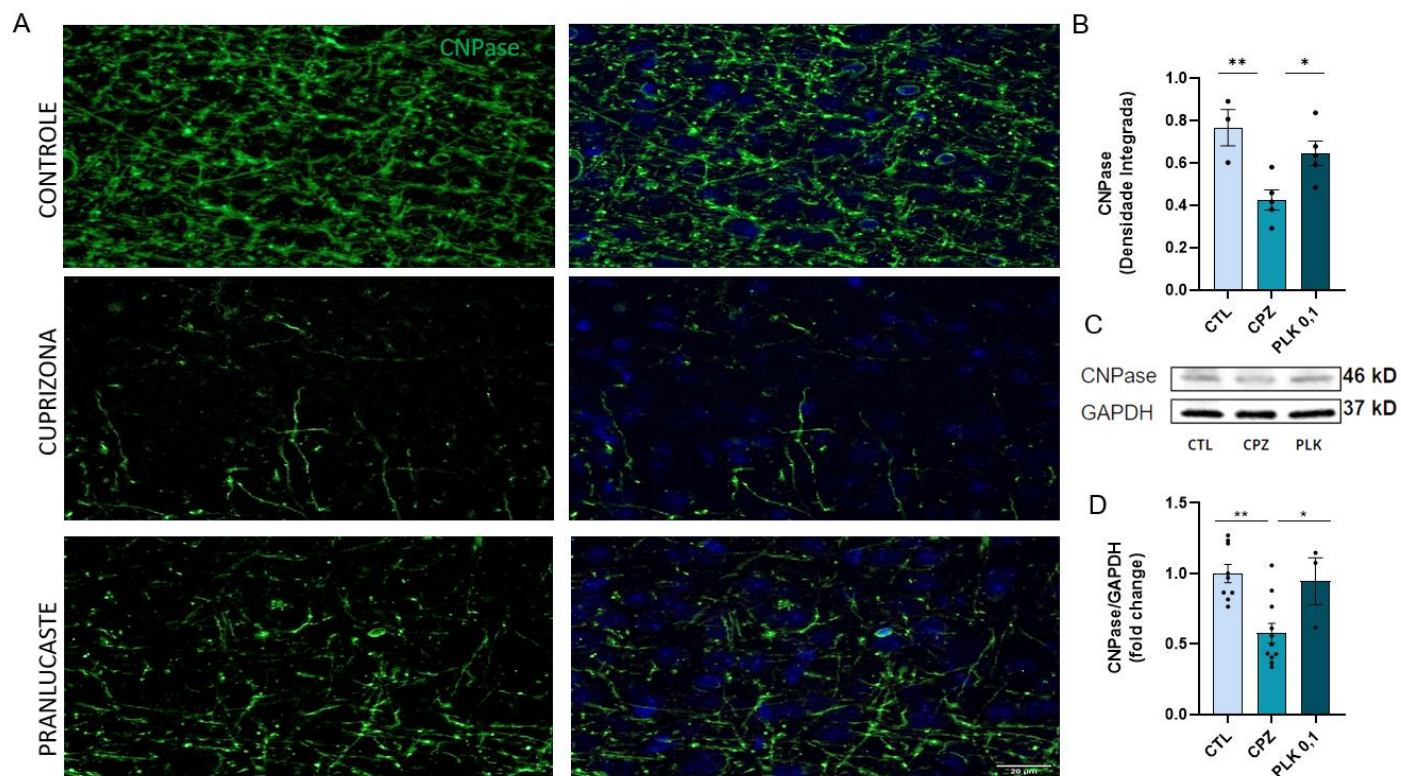


Figura 11. Imunomarcação de 2',3'-Ciclonucleot deo 3'-fosfodiesterase (CNPase)   reduzida na camada IV do córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona. Imunofluorescência para CNPase a partir de fatias do córtex visual na camada IV a partir de animais dos respectivos grupos. Marcação dos núcleos com DAPI. (B) Quantificação da densidade integrada de marcação de CNPase da camada IV. Aumento de 400x. (C) *Western blotting* para CNPase a partir de amostras do córtex visual. (D) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda relativa ao controle. Densidade da banda de GAPDH foi utilizada para normalização. (média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 20 μ m).

Notamos uma desmielinização significativa no córtex visual no modelo de EM induzido por CPZ. Por outro lado, a administração de PLK (0,1 mg/kg) demonstrou prevenir a desmielinização ao restaurar parcial ou completamente a presença de MBP e CNPase, respectivamente, na camada IV ou no córtex visual como um todo.

5.3 Pranlukaste   0,1 mg/ kg atenua a inflamação do modelo de EM induzido por cuprizona, sem afetar a reatividade astrocitária e microglial

A inflamação tem uma importância vital no desenvolvimento e manutenção da EM. A ativação astro- e microglial e a secreção de fatores pr -inflamatórios contribuem para a desmielinização e alterações sinápticas descritas (Espírito-Santo *et al.*, 2017; Coutinho *et al.*, 2023).

Dado que a reatividade dos astrócitos é um componente do processo inflamatório subjacente   patogênese tanto da EM quanto do modelo induzido por CPZ, procuramos

avaliar a modulação da GFAP após o tratamento com PLK (0,1 mg/kg). A expressão aumentada desta proteína astrocitária em contextos inflamatórios pode indicar reatividade dos astrócitos, pois astrócitos corticais não reativos geralmente expressam níveis reduzidos de GFAP (Araújo *et al.*, 2017). A análise por IF para GFAP revelou aumento na expressão da proteína no grupo CPZ em comparação aos níveis do controle no córtex visual ($p = 0,0328$) e na camada IV ($p = 0,0076$) (Fig. 12 A, B e C). Entretanto, esse perfil reativo não foi atenuado nos animais tratados com PLK no córtex e na camada IV ($p = 0,0538$ e $p = 0,0186$ respectivamente). Em consonância com estes resultados, também foi visto um aumento significativo na astrogliose por WB a partir de amostras do córtex visual total (Fig. 12 D e E) em CPZ ($p = 0,0166$) e PLK ($p = 0,0028$).

Ctl

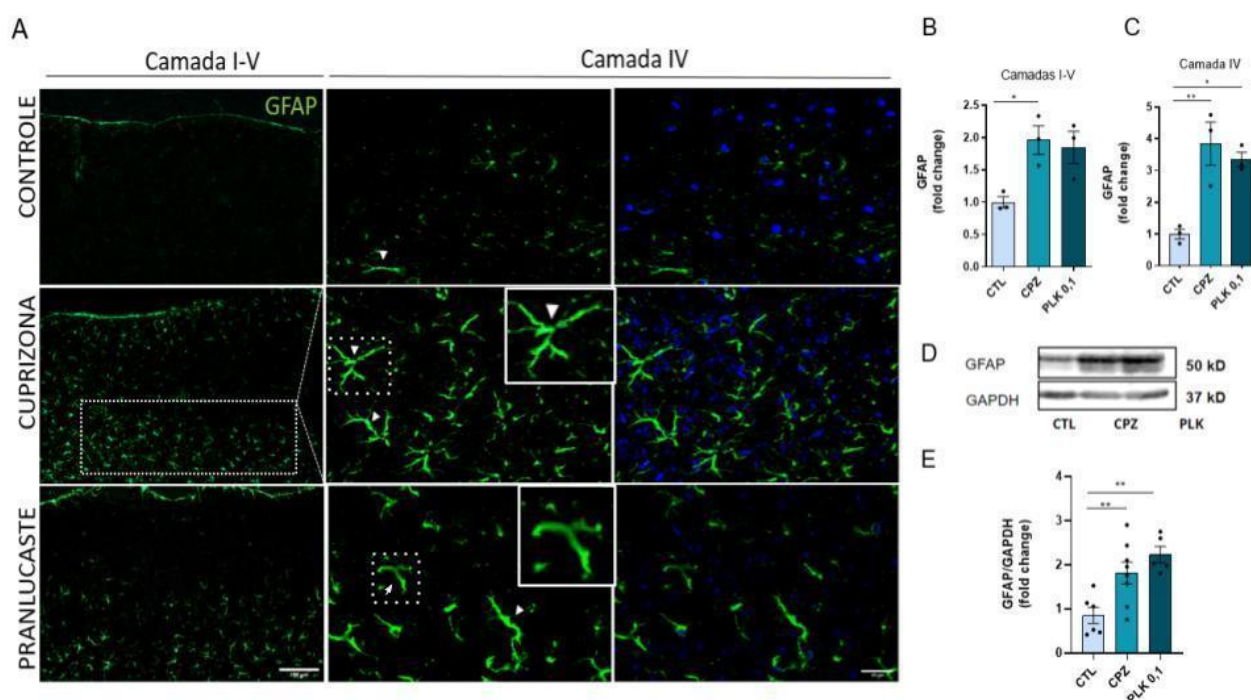


Figura 12. Reatividade astrocitária é aumentada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona. (A) Imunofluorescência para GFAP a partir das camadas I-V (100x) ou apenas na camada IV (400x) (retratada pelo retângulo branco) do córtex visual de animais dos respectivos grupos. Setas brancas ressaltando a morfologia celular. Marcação dos núcleos com DAPI. (B) e (C) Quantificação da densidade integrada de marcação de GFAP nas camadas I-V ou apenas na camada IV do córtex visual. (D) *Western blotting* para GFAP a partir de amostras do córtex visual primário. (E) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,1 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 100 μ m Camadas I-V ou 20 μ m Camada IV).

Apesar da densidade da GFAP entre CPZ e PLK não variar, é notável uma mudança no perfil morfológico astrocitário. No grupo PLK, astrócitos reativos para GFAP

assumem um perfil menos ramificado em comparação com CPZ (Fig. 12A setas brancas evidenciam a morfologia).

Outro tipo de célula glial envolvida no contexto neuroinflamatório da EM é a microglia, que pode ser identificada pela expressão de IBA-1 (Guerrero e Sicotte, 2020). Imunofluorescência para IBA-1 confirmou que o modelo CPZ ativa o perfil reativo microglial ($p = 0,0013$) (Fig. 13). O tratamento com PLK (0,1mg/ kg) também não reduziu a microgliose ($p = 0,0055$).

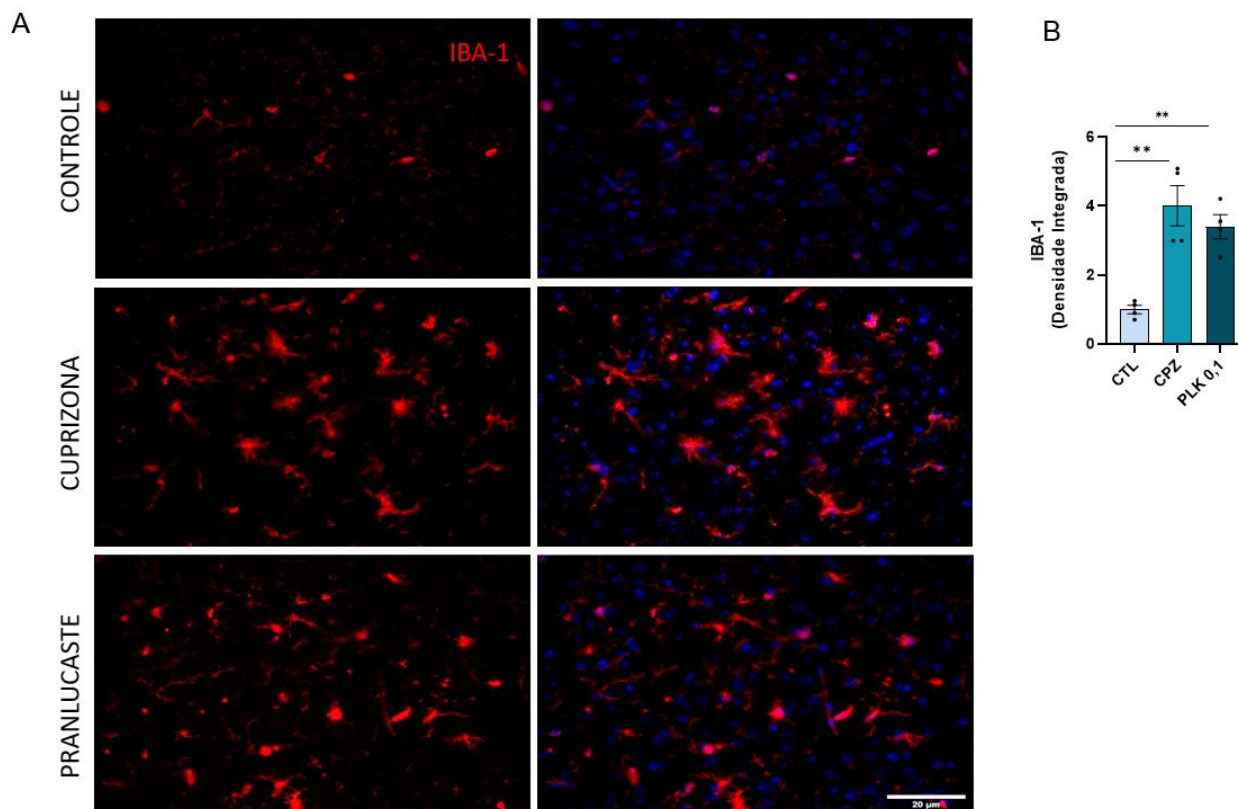


Figura 13. Reatividade microglial é aumentada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona. (A) Imunofluorescência para IBA-1 a partir da camada IV do córtex visual de animais dos respectivos grupos. Marcação dos núcleos com DAPI. Aumento de 400x. (B) Quantificação da densidade integrada de marcação para IBA-1 na camada respectiva. (média \pm SEM, ** $p < 0,01$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 20 μ m).

A análise da imunomarcção para IL-6 indicou um aumento da citocina na camada IV do córtex visual murino no tratamento com CPZ, corroborando com o aumento na reatividade glial vista no modelo (Fig. 13, $p = 0,0067$). De forma interessante, o tratamento preventivo com PLK reduziu significativamente os níveis de IL-6 disponíveis no córtex visual quando comparado ao grupo CPZ ($p = 0,0005$).

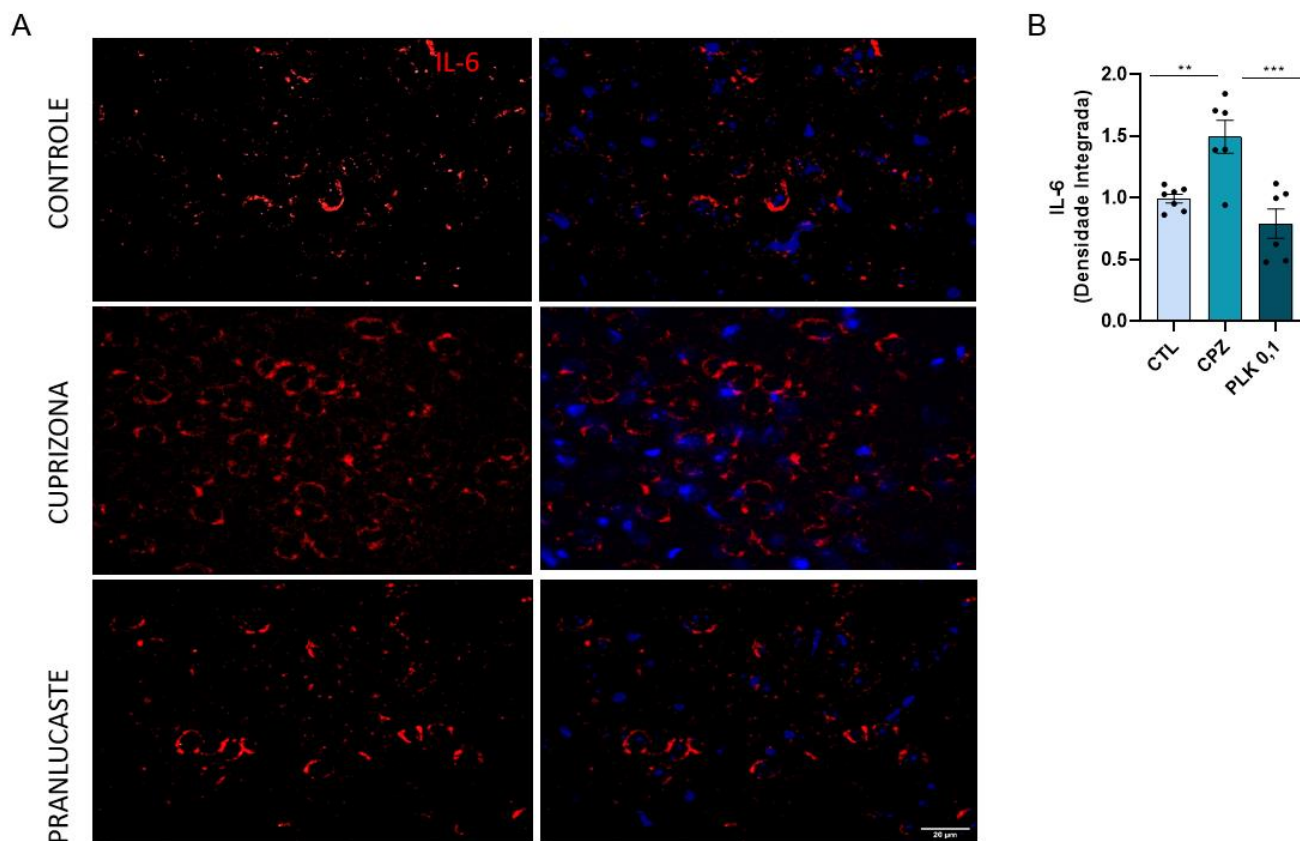


Figura 14. Densidade de interleucina 6 (IL-6) é regulada no córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona. (A) Imunofluorescência para IL-6 a partir da camada IV do córtex visual de animais dos respectivos grupos. Marcação dos núcleos com DAPI. Aumento de 400x. (B) Quantificação da densidade integrada de marcação para IL-6 na camada respectiva. (média ± SEM, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 20 μm).

Examinamos marcadores inflamatórios característicos da EM ao observar a atividade de astrócitos e microglias, bem como a expressão da citocina IL-6, após a administração de PLK (0,1 mg/kg) no modelo de CPZ. Embora o PLK não tenha mitigado diretamente a reatividade de astrócitos e microglia, notamos uma redução nos processos astrocitários, indicando uma possível regulação no padrão de atividade celular. Adicionalmente, a aplicação de PLK (0,1 mg/kg) resultou em uma significativa redução nos níveis de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, em comparação com o grupo tratado apenas com CPZ.

5.4 PLK atenua parcialmente as alterações sinápticas induzidas pelo modelo de EM

Foi descrito pelo nosso grupo que a ativação glial crônica e o consequente cenário pró-inflamatório altera a transmissão sináptica nas vias visuais subcorticais no modelo de CPZ, sendo um fenômeno crítico para o desenvolvimento e manutenção da

sinaptopatia (Espírito-Santo *et al.*, 2021). Com o intuito de relatar o efeito do PLK frente a sinaptopatia, foram avaliados diferentes aspectos sinápticos da EM.

Investigamos este aspecto no córtex visual e o efeito do tratamento com PLK por meio da análise da expressão da gefirina, uma proteína de densidade pós-sináptica inibitória. Observamos sua expressão aumentada no grupo CPZ também no córtex visual por meio de IF ($p = 0,0102$) e WB ($p = 0,0434$) (Fig. 15). Entretanto, o PLK não foi capaz de reverter tais alterações em ambas as análises, apesar de não diferir estatisticamente do CTL.

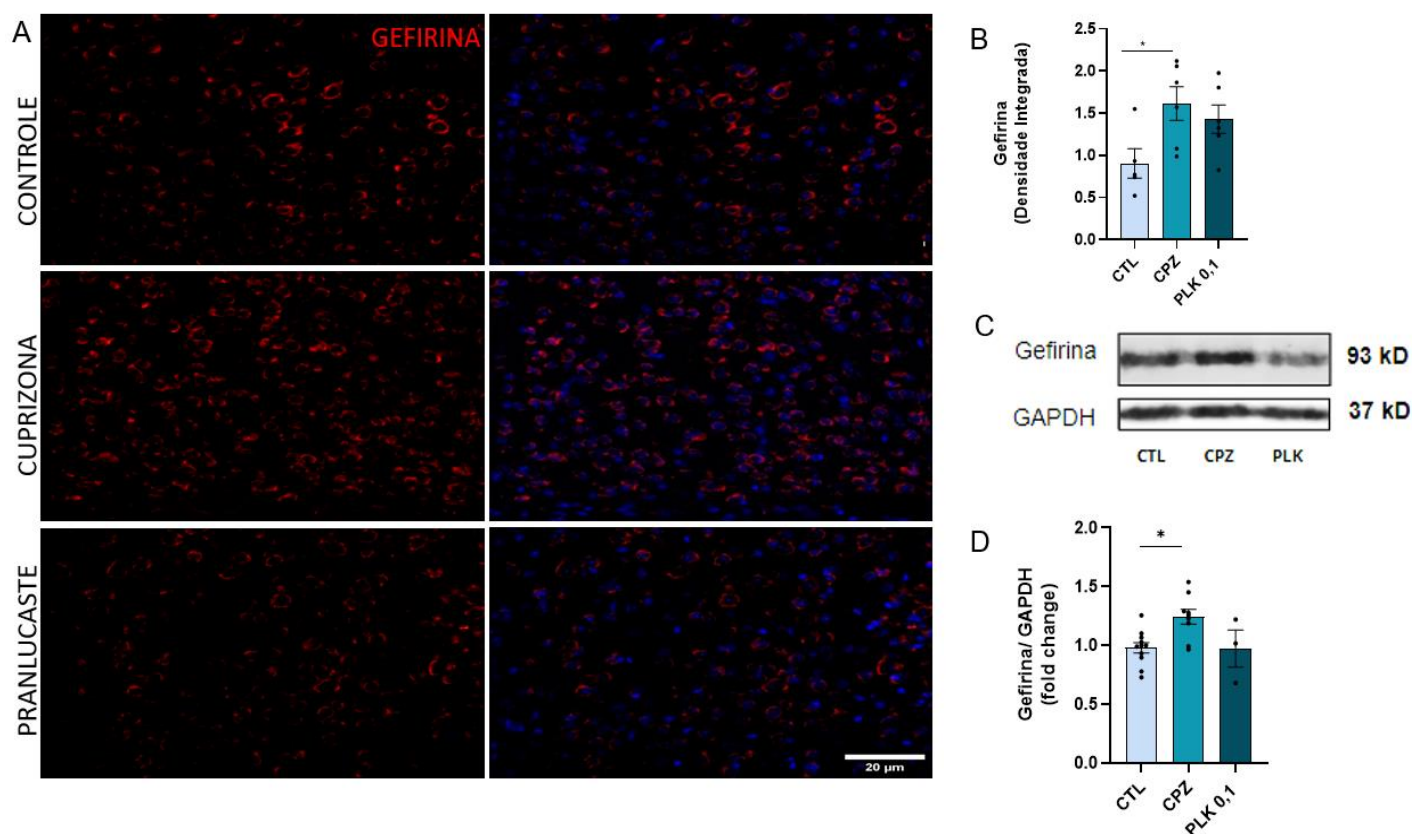


Figura 15. Densidade de sítios pós sinápticos inibitórios é aumentada na camada IV do córtex visual do animal modelo de esclerose múltipla (EM) induzido por cuprizona mas não no córtex como um todo. (A) Imunofluorescência para gefirina a partir da camada IV do córtex visual de animais dos respectivos grupos. Marcação dos núcleos com DAPI. Aumento de 400x. (B) Quantificação da densidade integrada de marcação para gefirina na camada respectiva. (C) *Western blotting* para gefirina a partir de amostras do córtex visual primário. (B) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,1 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 20 μ m).

Nosso grupo relatou a modulação das subunidades GluN2A/GluN2B em modelo animal de EM em regiões subcorticais (Araújo *et al.*, 2017). Aqui, caracterizamos essas alterações no córtex visual do modelo de CPZ e verificamos o efeito do PLK.

Inicialmente, avaliamos a expressão da subunidade GluN2A por WB, que não aparentou ser alterada entre os grupos experimentais (Fig. 16 A e B). Ao analisarmos a subunidade GluN2B por IF, notamos uma tendência de aumento em animais tratados com CPZ em comparação com o grupo controle ($p = 0,2313$). No entanto, devido ao N amostral reduzido, essa diferença não foi estatística (Fig. 16 C e D). Entretanto, observamos uma redução do PLK em comparação com a CPZ ($p = 0,0313$). Interessantemente, a análise qualitativa indica haver uma mudança na morfologia entre os grupos (Fig. 16 quadrados evidenciam a morfologia). Animais CTL apresentaram marcação que indicam presença ao redor da membrana e dentro da célula, enquanto os demais grupos pareciam estar expressos em regiões de neuritos ou em regiões que se assemelhavam a prolongamentos gliais.

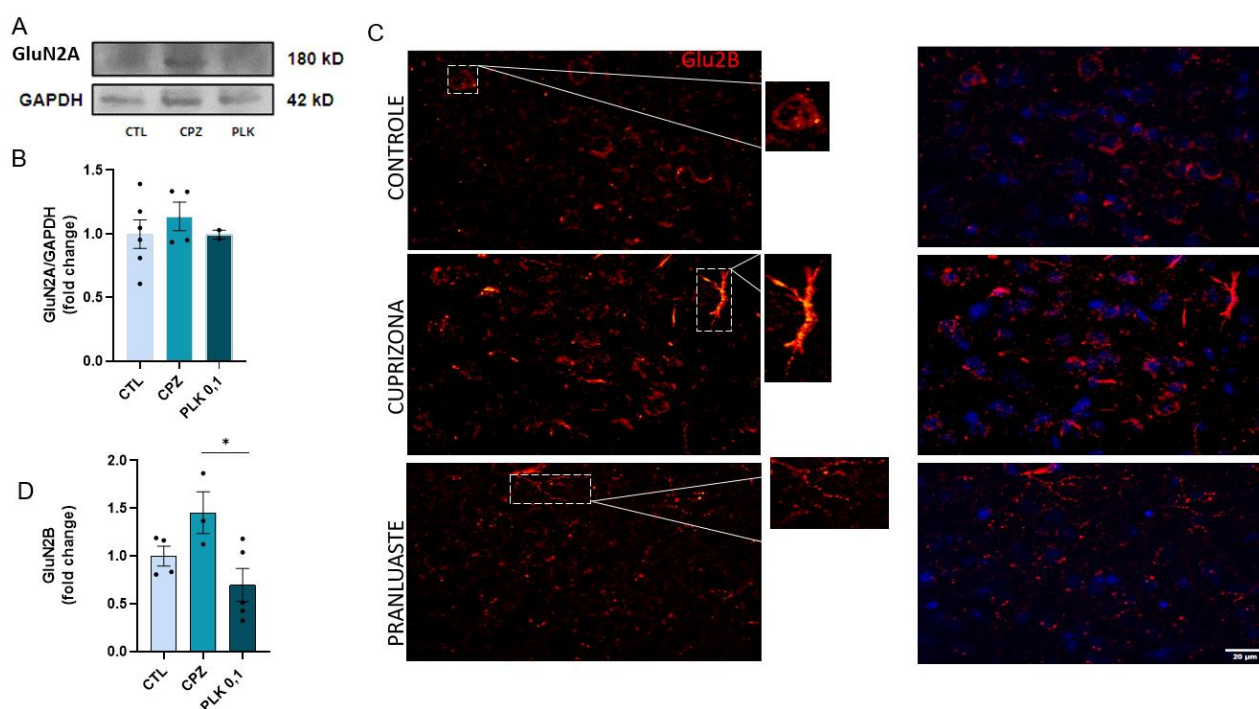


Figura 16. Participação das subunidades 2A e 2B dos receptores NMDA no córtex visual do animal modelo de EM induzido por cuprizona. (A) *Western blotting* para NMDA2A a partir de amostras do córtex visual primário. (B) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,1 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (C) Imunofluorescência para GluN2B a partir da camada IV do córtex visual de animais dos respectivos grupos. O quadrado pontilhado mostra a diferença morfológica entre os grupos. Marcação dos núcleos com DAPI. Aumento de 400x. (D) Quantificação da densidade integrada de marcação para GluN2B na camada respectiva. (média \pm SEM, * $p < 0,05$; one way-ANOVA e pós teste Tukey; barra de escala representa 20 μ m).

Em conjunto, estes resultados sugerem que o PLK pode favorecer a regulação de GluN2B no modelo de intoxicação por CPZ.

5.5 Tratamento preventivo com PLK à 0,1 mg/ kg promove aumento do transportador de glutamato no córtex visual em modelo de CPZ

A recaptação do glutamato é um evento essencial na prevenção de mecanismos excitotóxicos e é uma alteração presente nas disfunções encontradas na EM. No modelo de CPZ, foi observado por WB um aumento do conteúdo do transportador astrocitário GLAST quando comparados ao CTL ($p = 0,0024$), que sofreu ainda maior aumento no grupo PLK ($p = 0,0002$) comparado ao CPZ (Fig. 17 A e B). Por outro lado, não houve alterações no conteúdo do transportador GLT-1 entre os grupos (Fig. 17 C e D).

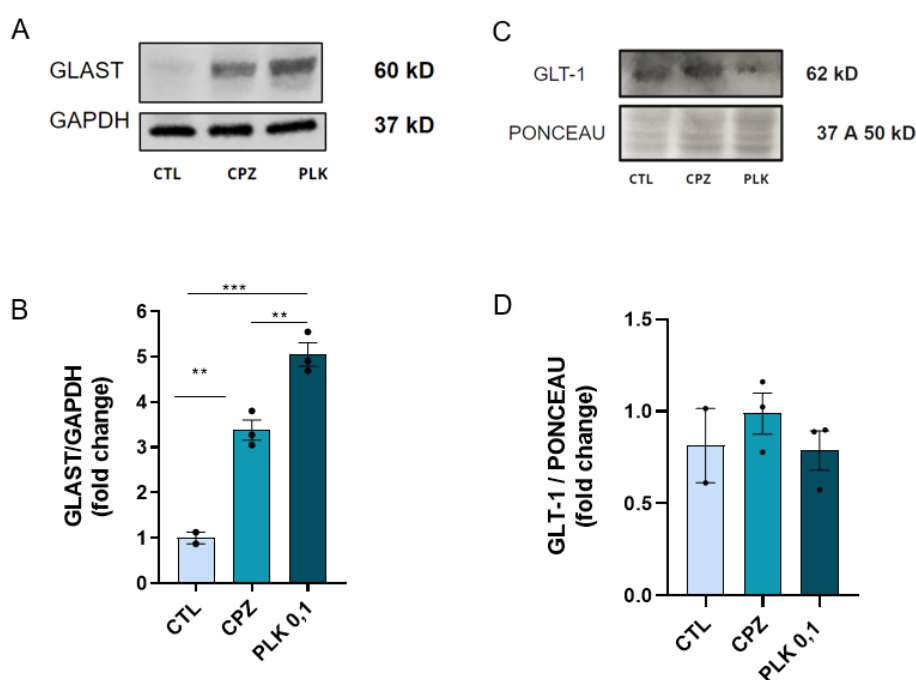


Figura 17. Recaptação de glutamato é modulada no córtex visual do animal modelo de EM induzido por cuprizona. (A) *Western blotting* para GLAST a partir de amostras do córtex visual primário. (B) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,1 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (D) *Western blotting* para GLT-1 a partir de amostras do córtex visual primário. (B) Quantificação do *Western blotting* com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,1 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por PONCEAU. (média \pm SEM, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; one way-ANOVA e pós teste Tukey).

Assim, os resultados indicam que o tratamento com PLK favorece mecanismos de recaptação de glutamato.

5.6 Tratamento preventivo com PLK à 0,2 mg/ kg previne a disfunção visual, mas não modula a desmielinização e ativação astrogliar induzida pela CPZ

Embora a concentração de PLK em 0,1 mg/kg seja amplamente empregada em

diversas condições experimentais, Ou *et al.* (2016) relataram efeitos benéficos na maturação de Olig através de injeções IP na dose de 0,1 mg/kg, administradas a cada 12 horas. Desta forma, uma vez que o tratamento preventivo com PLK na concentração de 0,1 mg/kg apresentou resultados muito promissores, decidimos investir em um aumento da dose para 0,2 mg/kg. Nosso objetivo era investigar se a atividade do medicamento poderia ser regulada de forma dose-dependente e, conseqüentemente, melhorar seus resultados.

Inicialmente, avaliamos a função do córtex visual dos animais nos respectivos grupos utilizando o teste do “*Visual Cliff*” descrito anteriormente (Fig. 18 A e B). Similar ao resultado obtido no primeiro teste, animais CTL tiveram maior taxa de descida e exploração para o LS ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$). Enquanto animais CPZ reproduzira, a análise anterior, não apresentaram preferências quanto ao lado de descida e explorando mais o lado S ($p = 0,5700$ e $p = 0,0434$ respectivamente). Já os animais tratados com a dose ajustada de PLK reproduziram o comportamento dos animais CTL, descendo e explorando significativamente mais para o LS ($p < 0,0005$ e $p < 0,0010$). De forma similar, os animais reproduziram o comportamento quando comparados ao grupo CPZ, ao descer e explorar significativamente mais o LS ($p = 0,0338$ e $p = 0,0052$, respectivamente).

Esses dados indicam que a dose ajustada do PLK (0,2 mg/kg) foi igualmente útil em prevenir o dano à visão de profundidade no modelo CPZ.

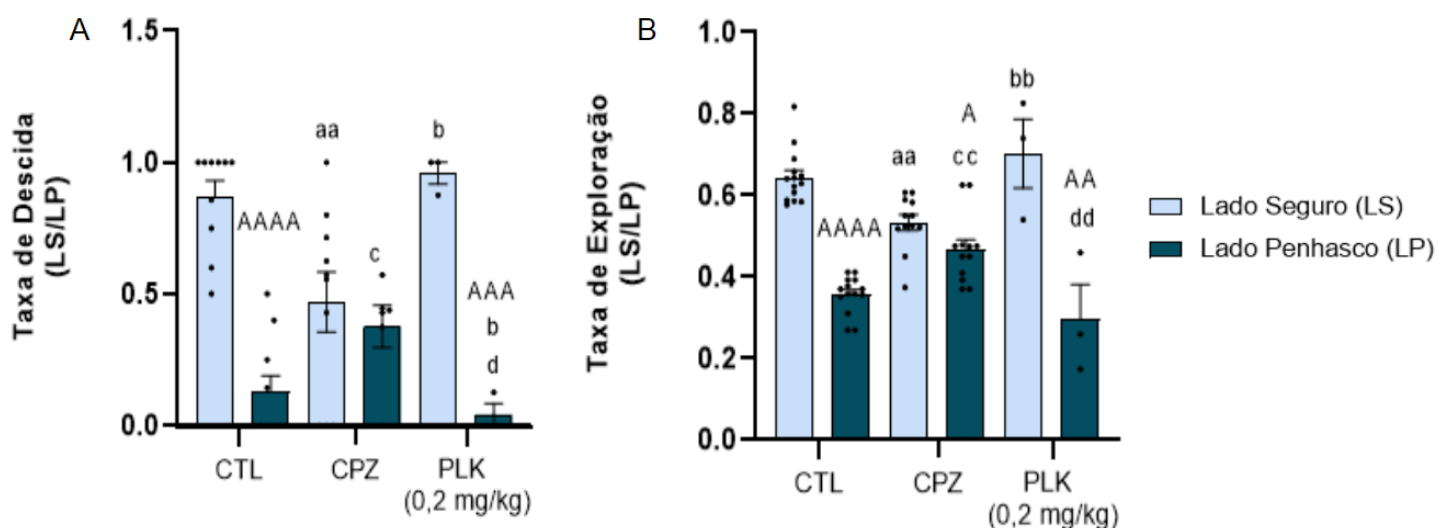


Figura 18. A visão de profundidade é modulada no modelo de cuprizona no teste Visual Cliff. (A) Taxa de descida do lado seguro (LS) e lado penhasco (LP) de animais dos grupos experimentais CPZ e PLK 0,2 mg/kg relativa ao CTL, submetidos ao teste comportamental Visual Cliff. Taxa obtida a partir do tempo de exploração do LS ou LP pelo tempo de exploração total. (B) Taxa de exploração do LS e LP de animais submetidos ao teste comportamental. Taxa obtida do total de descidas para o LS ou LP pelo total de descidas. Comparação intragrupo: A; onde A $p < 0,05$, AA, $p < 0,01$; AAA, $p < 0,001$; (média \pm SEM, teste-t para análises intragrupo). Comparações intergrupos: CTL LS (a), CPZ LS (b), CTL LP (c), CPZ LP (d); onde a, b, c $p < 0,05$, aa, bb, cc $p < 0,01$, aaa, bbb $p < 0,001$; (média \pm SEM, one way-ANOVA, pós teste Tukey).

Para investigar se a prevenção dos déficits visuais com a concentração aumentada reflete na atenuação de aspectos patogênicos da EM, avaliamos os mesmos parâmetros descritos anteriormente.

Na imunomarcação para CNPase por WB, o tratamento com PLK a 0,2 mg/kg não preveniu a desmielinização comparado ao CTL ($p = 0,0006$), sendo equivalente ao perfil desmielinizante da CPZ (Fig. 19 A e B).

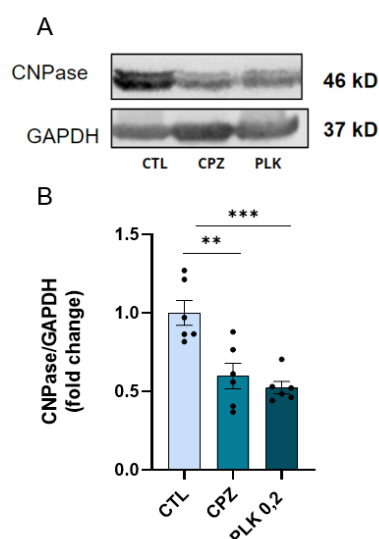


Figura 19. Concentração aumentada de PLK não é capaz de modular a mielinização. (A) Western blotting para CNPase a partir de amostras do córtex visual primário de animais dos grupos descritos e normalizadas por GAPDH. Quantificação do Western blotting (B) com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,2 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (média \pm SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; one way-ANOVA e pós teste Tukey).

A avaliação do perfil inflamatório glial através da marcação para GFAP por WB revelou não haver a prevenção da astrogliose na concentração aumentada de PLK ($p = 0,0264$) (Fig. 20 A e B).

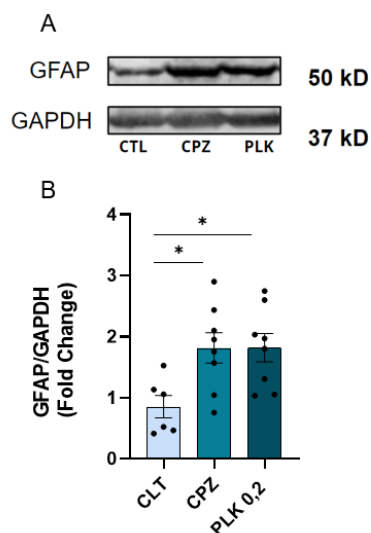


Figura 20. Concentração aumentada de PLK não é capaz de modular a astrogliose. (A) *Western blotting* para GFAP a partir de amostras do córtex visual primário de animais dos grupos descritos e normalizadas por GAPDH. Quantificação do *Western blotting* (B) com valor da densidade da banda dos grupos CPZ e PLK 0,2 mg/kg relativa ao CTL normalizadas por GAPDH. (média ± SEM, * $p < 0,05$; one way-ANOVA e pós teste Tukey).

A ausência de efeito na desmielinização utilizando a dose 0,2 mg/kg sugere que a dose inicialmente empregada no estudo (0,1 mg/kg) é mais eficaz no combate à desmielinização inflamatória observada no modelo.

6. DISCUSSÃO

Abordagens terapêuticas que atuem de forma abrangente influenciando os diferentes aspectos fisiopatológicos da EM (ativação de células imunológicas periféricas e residentes do SNC, desmielinização, sinaptopatia e neurodegeneração), permanecem um desafio (Healy *et al.*, 2022). A maioria dos fármacos disponíveis para EM atuam na imunossupressão ou imunomodulação, tendo como alvo células imunes periféricas. O efeito é a redução da migração linfocitária ao SNC, e redução da produção de mediadores inflamatórios (Hauser e Cree, 2020). Dessa forma, resultam na redução dos surtos inflamatórios, sem influenciar os mecanismos de reparo ou neuroprotetores (Mey e Desilva, 2023). Visando esse efeito mais abrangente, o presente estudo buscou explorar o potencial terapêutico preventivo do PLK no modelo de intoxicação por CPZ. Este fármaco é um anti-inflamatório de uso clínico que vem sendo descrito por seu papel na maturação de Olig e mecanismos remielinizantes (Ou *et al.*, 2016). PLK também foi descrito pela inibição de vias anti-sinaptogênicas como a Rho-A (Capra *et al.*, 2015) e tem demonstrado atenuação das aberrações sinápticas, e

dos aspectos neuroinflamatórios e neurodegenerativos em modelos de lesão isquêmica e a doença de Alzheimer (YU *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2014).

Utilizando concentração de 0,1 mg/kg, o PLK demonstrou ser eficaz em: 1) prevenir déficits na visão de profundidade, 2) prevenir a desmielinização, 3) atenuar a neuroinflamação e aspectos da sinaptopatia da EM. Enquanto a dose aumentada (0,2 mg/kg), apesar de ser útil em prevenir os danos funcionais no discernimento de profundidade, não apresentou efeitos moleculares protetores dentro dos parâmetros investigados. Ao abranger os 3 pilares da EM, desmielinização, inflamação e sinaptopatia, o PLK se apresenta como uma promissora terapia, que precisa de investigações mais profundas de modo a se compreender melhor os mecanismos pelos quais reduz os danos observados no modelo de EM.

Neste trabalho, utilizamos o córtex visual como região anatômica de interesse, uma vez que na EM até 80% dos pacientes sofrem de algum tipo de comprometimento visual (Bellingacci *et al.*, 2021). Frequentemente, pacientes com EM experimentam algum grau de disfunção visual, como neurite óptica, que é marcada pela inflamação e desmielinização do nervo óptico. Entretanto, é importante ressaltar que nem todos os pacientes com comprometimento visual apresentam neurite óptica, o que sugere que outros danos no sistema visual podem estar contribuindo para esses sintomas (Mey e DeSilva, 2023, Araújo *et al.*, 2017). Assim, na EM, ocorrem diversas alterações ao longo da via visual, desde a retina até áreas superiores do córtex visual e regiões associativas visuais (Graham e Klistorner, 2017).

O sistema visual se sobressai como uma das vias mais acessíveis para investigar comprometimentos no SNC, possibilitando uma análise não invasiva dos impactos da degeneração no comportamento animal (Marena *et al.*, 2022). Embora uma variedade de testes comportamentais sejam empregados para avaliar critérios de cognição, motricidade e estresse no modelo de CPZ (Zhang *et al.*, 2022; Sen *et al.*, 2019), até o momento não foram descritos os efeitos comportamentais da intoxicação por CPZ na função do córtex visual, que inclui o discernimento da visão de profundidade. Portanto, para preencher essa lacuna, utilizamos um teste comportamental estabelecido, o *Visual Cliff*, adaptado ao nosso contexto (Fox *et al.*, 1965).

O *Visual Cliff* é um teste bem estabelecido utilizado para identificar danos do sistema visual (Fox *et al.*, 1965). A análise da função visual foi objetiva e eficientemente avaliada pelo *Visual Cliff* na disfunção retiniana e degeneração por lisolecitina

(Tzameret *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2022). No nosso trabalho, o teste comportamental destacou o comprometimento visual de animais do grupo CPZ, que não enxergam corretamente a profundidade da região que simula o penhasco da região segura. Em contrapartida, os animais tratados com PLK (0,1 mg/kg) recuperaram a capacidade sensorial de avaliar a profundidade de forma eficaz, evitando significativamente o LP. Indiscutivelmente, o teste revelou-se eficaz em contrastar animais de acordo com o comprometimento pela primeira vez no modelo de CPZ.

O comprometimento comportamental é reflexo das alterações moleculares que identificamos por meio das análises realizadas no córtex visual. Esta região crítica é responsável pelo processamento da visão de profundidade. Especificamente, a camada IV do córtex visual, examinada neste estudo, é descrita como a primeira região neural a integrar informações provenientes de ambos os olhos, um processo essencial para a percepção precisa da distância e da localização relativa dos objetos no espaço tridimensional. Essa integração de informações binoculares na camada IV do córtex visual nos permite discernir com precisão a profundidade e a distância dos objetos ao nosso redor (Purves *et al.*, 2010; Guido, 2018). Dessa forma, prejuízos em qualquer etapa da via visual, compromete que a informação chegue até a região de processamento no córtex visual, gerando o comprometimento funcional do sistema (Purves *et al.*, 2010).

Analisando mais profundamente a camada IV e o córtex visual como um todo, constatamos um comprometimento significativo do sistema visual no modelo de intoxicação por CPZ em vários níveis. Neste estudo, observamos que a desmielinização induzida no córtex visual após 5 semanas de intoxicação com CPZ a 0,2% resultou em uma acentuada perda das proteínas da mielina MBP e CNPase, conforme evidenciado pelas análises de IF e WB, confirmando a eficácia do modelo em replicar as alterações características da desmielinização na EM. Estes achados estão em consonância com estudos anteriores que demonstram que a CPZ a 0,2% leva ao comprometimento do sistema visual, com desmielinização no nervo óptico, núcleo geniculado lateral (região subcortical), além de gerar prejuízos funcionais na condução nervosa ao longo de vias visuais (Hainz *et al.*, 2017; Araújo *et al.*, 2017; Marenna *et al.*, 2022).

Após confirmarmos o modelo de desmielinização, procedemos com a avaliação dos efeitos do tratamento com PLK (0,1 mg/kg). Os resultados revelaram que o

tratamento com PLK (0,1 mg/kg) foi eficaz na prevenção parcial ou total da perda de MBP e CNPase, respectivamente. Isso sugere um potencial terapêutico promissor contra a desmielinização do córtex visual no modelo CPZ. Embora não haja estudos específicos que investiguem a atividade do PLK na prevenção da desmielinização na CPZ, evidências suportam o efeito benéfico do PLK na mielinização em diversos contextos. Através da inibição de GPR17, PLK (0,1 mg/kg a cada 12 horas) promoveu a remielinização induzida por lisolecitina, outro modelo animal de EM (Ou *et al.*, 2016). Hennen *et al.* (2013) anularam completamente a sinalização de GPR17 de forma dose-dependente com PLK (30 μ M) *in vitro*, regulando positivamente a densidade de Olig maduros.

A inibição de GRP17 pelo PLK, e consequente proteção a mielina, pode ser atribuída a homologia que existe entre CysLTR e GPR17, tornando-o altamente suscetível ao antagonismo pelo PLK (Ciana *et al.*, 2006). Assim, além de prevenir a desmielinização na CPZ, é viável acreditar que PLK regula positivamente mecanismos de maturação e sobrevivência de oligodendrócitos, através da inibição de GPR17. Contudo, não podemos descartar que os efeitos do PLK sobre a mielina possam ser em decorrência de uma redução do processo inflamatório (visualizado pela reduzida imunomarcção de IL-6 nos nossos resultados), tendo em vista que ele também atua como antagonista do CysLTR. Embora o mecanismo de ação endógeno conhecido do PLK seja o antagonismo de CysTLR₁, é importante ressaltar que existem outras classes de antagonistas de leucotrienos que não exercem as funções descritas aqui pelo PLK (Gelosa *et al.*, 2017). Por exemplo, o montelucaste, outro antagonista do mesmo receptor, mostrou ter menor afinidade pelo GPR17 em comparação com o PLK (Hennen *et al.*, 2013). Tendo por isso tido sua utilização preterida em relação ao PLK no presente estudo

Outro mecanismo que poderia justificar a proteção da mielina pelo PLK, é a capacidade de inibir RhoA, uma GTPase descrita por regular negativamente a diferenciação de OPCs (Capra *et al.*, 2015; Sterns *et al.*, 2021). Baer *et al.* (2009) obtiveram maior taxa de diferenciação de Olig ao silenciar ou inibir farmacologicamente Rho-A, postulando-o como um dos fatores inibitórios da mielinização. Este efeito é refletido pela afinidade do PLK pelo CysLTR₂, o que lhe permite regular a GTPase Rho-A (Capra *et al.*, 2015). Essas evidências sugerem uma regulação mais específica e robusta do PLK sobre o CysLTR. Seja através de GRP17, Rho-A ou ambos, esses

dados indicam fortemente possíveis mecanismos de ação em que o PLK pode estar atuando para prevenir a desmielinização. Dessa forma, mais estudos precisam ser desenvolvidos para desvendar o mecanismo de ação ativado pelo PLK que culmina na prevenção dos danos observados. Nosso resultado contribui para a compreensão da desmielinização induzida pela CPZ no córtex visual, especialmente quando consideramos a intervenção farmacológica do PLK. Este aspecto, até então não explorado na literatura, adiciona uma nova perspectiva ao uso do PLK em condições desmielinizantes, sendo essencial compreender pontualmente os mecanismos subjacentes a essa condição.

Paralelamente à desmielinização, a inflamação e a ativação das células gliais têm papel central na fisiopatologia da EM, contribuindo significativamente para a desmielinização e o dano axonal (Healy *et al.*, 2022). O modelo de desmielinização induzida pela CPZ permite investigar o papel dessas células frente à patologia desenvolvida. Assim, nos concentramos em avaliar o tratamento com PLK frente a ativação inflamatória das células gliais. Como esperado, notamos um aumento significativo na reatividade astrocitária de animais submetidos à dieta com CPZ. De forma similar, a astrogliose foi descrita no corpo caloso de camundongos tratados em 3 e 5 semanas com CPZ, assim como características de hipertrofia e níveis elevados de GFAP (Kim *et al.*, 2018; Sen *et al.*, 2022). Nosso grupo relatou o aumento significativo nos níveis de GFAP no núcleo geniculado lateral (Araújo *et al.*, 2017). No hipocampo e no corpo caloso, a ativação glial foi vista precocemente à desmielinização, em um modelo de exposição a curto prazo com CPZ (1 semana) (Tezuka *et al.*, 2013). Dessa forma, o aumento dos níveis de GFAP no córtex visual murino, observado no presente estudo, está de acordo com o que já foi descrito na literatura para o modelo.

Adicionalmente, o tratamento com PLK (0,1 mg/kg) não modulou a reatividade astrogliar. No entanto, em outros modelos inflamatórios e isquêmicos, o tratamento com PLK foi capaz de reduzir a reatividade astrocitária. Fang *et al.* (2006) relataram que o tratamento com PLK (0,01 e 0,1 mg/kg) reduziu a astrogliose em modelo de isquemia. Yu *et al.* (2022) observaram redução na astrogliose com PLK (0,1 mg/kg IP) em modelo de meningite induzida por *Streptococcus pneumoniae*. Embora os níveis de GFAP não tenham sido influenciados pelo tratamento com PLK (0,1 mg/kg), observamos que, no grupo tratado, houve uma menor hipertrofia na morfologia dos astrócitos em comparação com o grupo CPZ. A análise qualitativa das alterações morfológicas nos

astrócitos induzidas pelo PLK, pode indicar mudanças na ativação ou na função dessas células em resposta à intoxicação por CPZ. No entanto, é importante ressaltar que a análise qualitativa não é suficiente para avaliar o perfil de reatividade dos astrócitos. São necessários ensaios que combinem marcadores moleculares de neurotoxicidade e neuroproteção, juntamente com a presença de astrócitos (Escartin *et al.*, 2021; Cruz, 2023 em fase de pré-publicação).

Prosseguindo com as análises sobre a atividade inflamatória no modelo, investigamos a ativação da microglia. A IF revelou um aumento nos níveis de IBA1 no grupo tratado com CPZ, corroborando com achados anteriores em outras regiões como o corpo caloso, cerebelo, córtex e no núcleo geniculado lateral, onde a ativação microglial atingiu seu ápice em 5 semanas de intoxicação por CPZ (Buschmann *et al.*, 2012; Mohammadi *et al.*, 2021; Petkovic *et al.*, 2017; Roufagalas *et al.*, 2021; Araújo *et al.*, 2017). Assim como ocorreu com a astrogliose, a administração de PLK na dose de 0,1 mg/kg não exerceu influência sobre a reatividade microglial, conforme avaliado pela IF para IBA-1. Essa observação está em consonância com dados previamente descritos na literatura em diferentes modelos experimentais. O PLK (0,01 e 0,1 mg/kg) não reduziu a migração e acúmulo de macrófagos/microglias CD11b+ em um modelo de isquemia, apesar de regular a ativação e fagocitose microglial (Chu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). No entanto, em um modelo de neurotoxicidade ou depressão induzida por lipopolissacarídeo, concentrações mais elevadas de PLK (0,8 mg/kg e 0,6 mg/kg), suprimiram os níveis de IBA-1 (Chen *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017). Esses dados indicam que o PLK pode modular a ativação microglial de forma dependente da dose, sugerindo que a dose utilizada no estudo pode não ter sido suficiente para avaliar adequadamente esse efeito.

Analisando a inflamação por meio de mediadores inflamatórios, é conhecido que a ativação das células gliais leva à expressão e liberação de citocinas e quimiocinas (Tezuka *et al.*, 2013). A IL-6 é uma das principais citocinas pró-inflamatórias elevadas na EM. Sua presença está fortemente associada ao agravamento da doença e à redução da plasticidade sináptica, enquanto sua ausência resulta na falta de desmielinização na EAE (Shobeiri *et al.*, 2022; Eugster *et al.*, 1998; Stampanoni *et al.*, 2019; Eugster *et al.*, 1998). Em nosso estudo, observamos um aumento significativo nos níveis de IL-6 no córtex visual de animais intoxicados por CPZ, em concordância com dados da literatura. Em particular, com apenas 8 dias de intoxicação por CPZ, a

IL-6 é altamente expressa no corpo caloso (Kim *et al.*, 2017). Além disso, a exposição de curto prazo à cuprizona (1 semana) induz a expressão de IL-6 em astrócitos, mas não na microglia, antes da ocorrência da desmielinização no corpo caloso (Tezuka *et al.*, 2013). An *et al.* (2020) relataram aumento na produção de IL-6 no homogeneizado cerebral em duas, quatro e, de forma mais pronunciada, em seis semanas de exposição a CPZ. Por outro lado, a administração de PLK (0,1 mg/kg) resultou em uma redução significativa nos níveis de IL-6, restaurando-os aos valores observados no grupo CTL. Esta é a primeira vez que a redução da IL-6 mediada pelo PLK é relatada em um modelo de EM, embora as propriedades imunomoduladoras do PLK sejam amplamente investigadas devido ao seu uso clínico em condições inflamatórias. Níveis de IL-6 no líquido de pacientes com epilepsia diminuíram significativamente após o tratamento com PLK (Takahashi *et al.*, 2013). Estudos anteriores demonstraram que o PLK inibe a produção de IL-6 induzida por lipopolissacarídeo em células mononucleares do sangue periférico, através da inibição da translocação do fator de transcrição NF- κ B nuclear (Liu *et al.*, 2022; Ichiyama *et al.*, 2003). Embora o mecanismo subjacente a esse efeito não seja totalmente compreendido, sabe-se que não está relacionado ao antagonismo do receptor CysLTR₁ (Ichiyama *et al.*, 2003; Tomari *et al.*, 2003; Ishinaga *et al.*, 2005). Acreditamos que, ao reduzir os níveis de IL-6, o PLK desempenha um papel importante na diminuição da inflamação, o que poderia contribuir para a redução da hipertrofia astrocitária observada (Tezuka *et al.*, 2013).

A persistência da ativação inflamatória e o perfil de mediadores podem afetar a transmissão sináptica e a plasticidade (Stampanoni *et al.*, 2019). As anormalidades sinápticas decorrentes do ambiente inflamatório emergem como um dos principais mecanismos subjacentes à EM (Mandolesi *et al.*, 2015; Musella *et al.*, 2015). Pela primeira vez, é descrito o efeito do tratamento com PLK na sinaptopatia da EM.

Similar ao descrito pelo nosso grupo no tálamo visual (Araújo *et al.*, 2017), observamos um aumento significativo na densidade sináptica inibitória no córtex visual de animais tratados com CPZ, evidenciado pela IF para geferina. Por outro lado, a perda de elementos pós-sinápticos inibitórios no hipocampo e no córtex motor também é relatada (Ramaglia *et al.*, 2021; Zoupi *et al.*, 2021). A discrepância nos resultados pode ser atribuída a diferenças na resposta adaptativa dos circuitos neurais em regiões específicas do cérebro. A variabilidade anatômica e funcional entre diferentes regiões cerebrais pode levar a respostas distintas aos efeitos induzidos pela CPZ. Nossos

dados, em consonância com dados do grupo, sugerem que a sinaptopatia no sistema visual resulta no predomínio das sinapses inibitórias (Araújo *et al.*, 2017, de Pádua, 2023 em fase de pré-publicação). Uma vez que sinapses inibitórias são um contrapeso à sinalização glutamatérgica, o aumento observado pode refletir em um mecanismo compensatório para modular a excitabilidade neural e atenuar a hiperexcitabilidade (Araújo *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2012). O tratamento com PLK (0,1 mg/kg) não afetou os níveis de geferina, indicando que seu mecanismo de ação não influencia a regulação de proteínas associadas à densidade sináptica inibitória.

A fim de aferir a respeito da ativação de sinapses excitatórias, avaliamos os níveis das subunidades GluN2A e GluN2B dos NMDAR no córtex visual. Observamos que a expressão de GluN2A não sofreu alterações no modelo ou no tratamento com PLK (0,1 mg/kg). Nosso grupo demonstrou que os níveis de GluN2A não são regulados no núcleo geniculado lateral em 3 ou 5 semanas de alimentação com CPZ (Araújo *et al.*, 2017). Sühs *et al.* (2016) também não observaram variações nos níveis de GluN2 no córtex em 5 semanas de alimentação com CPZ. Em contrapartida, Tameh *et al.* (2013) descreveram o aumento de GluN2A no corpo caloso desmielinizado por 5 semanas de CPZ. Estes indícios indicam que a variação nos níveis desta subunidade na CPZ ocorre de forma regionalmente específica no SNC no modelo CPZ.

Ao investigar a expressão da subunidade GluN2B dos receptores NMDA durante a intoxicação por CPZ, observamos uma forte tendência ao aumento dos níveis de GluN2B, embora não tenha alcançado significância devido ao reduzido tamanho da amostra em CPZ. Nosso grupo descreveu no núcleo geniculado lateral um aumento da subunidade GluN2B nas sinapses que convergiam para neurônios inibitórios, indicando um aumento na inibição da atividade neural (Araújo *et al.*, 2017). Apesar de não haver alterações significativas nos níveis do receptor, em uma análise qualitativa observamos uma variação morfológica entre os grupos experimentais. A morfologia do CTL indicou sua presença no corpo celular, refletindo o perfil de GluN2B em sinapses no corpo celular. Embora as sinapses ativas sejam comumente encontradas em grande número nos dendritos, um menor número delas também pode ser encontrado no corpo celular (Yang *et al.*, 2020). Devido à integração e potencialização das entradas sinápticas, as sinapses no soma sofrerem menor atenuação progressiva como a que ocorre ao longo dos dendritos. As sinapses somáticas são consideravelmente mais potentes do que as dendríticas, apesar de estarem em menor número (Bao *et al.*, 2021). Estudos anteriores

descreveram que NMDAR desempenham importante atividade na geração de potenciais de ação soma. Como sinapses somáticas são menos ativas, a subunidade mais abundante nessas regiões é a GluN2B extra-sinápticos (Bao *et al.*, 2021). É descrito que a intoxicação por CPZ pode modular a proporção entre GluN2B e GluN2A (Araújo *et al.*, 2017). A tendência de aumento da subunidade GluN2B em detrimento da GluN2A pode afetar profundamente a transmissão sináptica (Paoletti *et al.*, 2013). Isto ocorre devido às propriedades funcionais associadas à ativação de GluN2B, como cinética de decaimento lento. Estes fatores influenciam diretamente a ocorrência da depressão de longa duração (LTD), caracterizada pela redução na eficácia da transmissão sináptica. Por conseguinte, um aumento na atividade de GluN2B demanda uma estimulação mais intensa para induzir a potenciação de longa duração (LTP), que resulta no aumento da eficácia da transmissão sináptica (Paoletti *et al.*, 2013). Por fim, gera-se um influxo excessivo de Ca^{2+} e ativação de vias degenerativas, como descrito anteriormente.

É possível que a tendência de aumento de GluN2B na CPZ, induza um recrutamento axonal e dendrítico da subunidade, o que justificaria a mudança morfológica. Dentre as subunidades de NMDAR, GluN2B extrassináptico são as que exibem maior mobilidade entre o corpo celular e regiões axonais, que pode ser regulado pela atividade neuronal (Vieira *et al.*, 2021). Petralha *et al.* (2010) observaram a presença de GluN2B extra-sináptico localizado ao longo de dendritos e espinhas pós-sinápticas. Na maioria dos casos, a subunidade é descrita como acumulada em pontos próximos a processos celulares adjacentes, incluindo axônios ou células gliais (Petralha *et al.*, 2010).

Em uma análise qualitativa, observamos que a marcação de GluN2B na CPZ apresentou similaridade com a localização axonal e dendrítica, além de estar presente em estruturas que se assemelham a processos astrocitários. NMDAR funcionais estão presentes em astrócitos, diferindo dos receptores neuronais na sensibilidade e permeabilidade iônica (Verkhratsky e Nedergaard, 2020; Gottlieb e Matute, 1997). Em resposta a injúrias no SNC, inclusive na intoxicação por CPZ, GluN2B são significativamente mais expressos em processos astrocitários reativos (Sühs *et al.*, 2016; Verkhratsky e Chvátal, 2020). Sua participação neste contexto não é bem esclarecida, entretanto possivelmente age como uma resposta ao dano neuronal e excitotoxicidade do glutamato (Krebs *et al.*, 2003; Verkhratsky e Kirchhoff, 2007).

Letellier *et al.* (2016) descreveram que a ativação de NMDAR no astrócito causa despolarização local e liberação de cálcio, resultando na liberação de gliotransmissores inibitórios. O resultado seria o fortalecimento inibitório nas sinapses excitatórias, enquanto as sinapses de alta probabilidade são preferencialmente protegidas da inibição. Estes dados indicam que a expressão aumentada de GluN2B em astrócitos, pode ser uma resposta a excessiva estimulação glutamatérgica. Dessa forma, o aumento dos níveis de GluN2B extra-sináptico, pode ser relacionado ao aumento dos níveis de glutamato e seu transbordamento descrito no modelo CPZ (Lee *et al.*, 2020). Neste contexto, o aumento de GluN2B em detrimento de GluN2A pode ativar vias de morte celular. Entretanto, para fundamentar a avaliação qualitativa da presença de GluN2B em astrócitos, são necessárias análises que co-localizam GluN2B com marcadores de neuritos e astrócitos. Tais mecanismos precisam ser mais investigados para compreender a participação da subunidade no contexto descrito.

Em contrapartida, apresentamos pela primeira vez que o tratamento com PLK na dose de 0,1 mg/kg, reduz de maneira significativa os níveis de GluN2B no córtex visual de camundongos no modelo CPZ. Este feito pode ser relacionado à atividade antiinflamatória do PLK, uma vez que mecanismos de excitotoxicidade podem ativar vias de sinalização inflamatórias (Marques *et al.*, 2022). Foi descrito que a excitotoxicidade desencadeada por NMDA induz a ativação de CysLTR₁ (Marques *et al.*, 2022; Ding *et al.*, 2006). Em modelo *in vitro* de isquemia, a liberação de glutamato e ativação excessiva de NMDAR, induz a produção de CysLT em resposta ao ambiente inflamatório (Ge *et al.*, 2006). Zhang *et al.* (2005) inibiram lesão isquêmica induzida por microinjeção de NMDA com o tratamento de PLK a 0,3 mg/kg. Ding *et al.* (2006) relataram um aumento na expressão de CysLTR₁ no córtex e no hipocampo 24 horas após lesão isquêmica induzida por injeção de NMDA, que foi reduzida pelo antagonismo do PLK (0,1 mg/kg). Neste estudo, o antagonismo de CysLTR₁ pelo PLK (0,1 mg/kg) reduziu o volume da lesão isquêmica de forma similar a ketamina (30 mg/kg), um inibidor de NMDAR (Ding *et al.*, 2006). Esses achados sugerem que CysLTR₁ medeia a neurotoxicidade em diferentes modelos, sendo o PLK capaz de reduzir tais danos indiretamente através dos receptores.

Estas evidências suportam o papel prejudicial da subunidade GluN2B frente a injúrias do SNC, apontando para um efeito neuroprotetor na redução da subunidade. Tendo em vista a redução de GluN2B pelo PLK (0,1 mg/kg) no córtex visual no modelo

descrito, sugere-se que o papel terapêutico do PLK pode desencadear um potencial efeito neuroprotetor, contribuindo para melhorias na função sináptica e para a proteção contra disfunções neurológicas.

Decorrente das alterações inflamatórias e sinápticas, a homeostase do glutamato é comumente alterada na EM, e falhas na recaptação do neurotransmissor estão altamente envolvidas na patologia e reparo da doença (Vercellino *et al.*, 2007; Vallejo *et al.*, 2006; Stojanovic *et al.*, 2014). Buscando explorar os efeitos das alterações descritas na homeostase do glutamato, avaliamos os níveis dos transportadores de glutamato astrocitário GLAST e GLT-1. Em nosso trabalho, não foram identificadas alterações nos níveis de GLT-1 no córtex visual. No entanto, observou-se uma regulação positiva significativa de GLAST com o tratamento de CPZ. Em consonância com nossos dados, Amazi *et al.* (2013) não observaram alterações a nível gênico ou proteico de GLT-1 no córtex telencefálico após tratamento com CPZ. GLAST, no entanto, aumentou a nível de mRNA e da proteína, sendo co-marcado com astrócitos GFAP+ (Amazi *et al.*, 2013). Apesar de GLT-1 ser o transportador mais expresso em animais adultos, responsável por 90% do transporte extracelular de glutamato nos astrócito, em regiões como o córtex, retina e cerebelo o GLAST é mais prevalente (Liu *et al.*, 2022; Olivares-Bañuelos *et al.*, 2019; Gruol *et al.*, 2020; Tameh *et al.*, 2013). O aumento na expressão gênica de GLAST, em conjunto com a desmielinização e gliose, foi relatado no córtex após 5 semanas com CPZ (Tameh *et al.*, 2013; Azami *et al.*, 2013). A nível proteico, os níveis do transportador foram 30% mais altos, cuja expressão estava restrita aos astrócitos GFAP+. Vallejo *et al.* (2006) descreveram o aumento na expressão gênica e proteica de EAAT1, que corresponde a GLAST em humanos, em análises do nervo óptico *post mortem*. No estudo em questão, a elevada expressão desses transportadores se refletiu em seu aumento funcional, promovendo uma maior captura de glutamato no nervo óptico *in vivo*. No sistema visual, a regulação dos transportadores parece acompanhar a progressão da doença.

Em contradição com nossos dados, diversos estudos apontam para uma regulação inversamente proporcional entre a progressão da doença e os níveis dos transportadores de glutamato (Mandolesi *et al.*, 2015). Ohgoh *et al.* (2002) e Olechowski *et al.* (2010) relataram perda na expressão de GLT-1/GLAST na medula espinhal na EAE, enquanto Mandolesi *et al.* (2013) descreveram a redução de GLAST no cerebelo no mesmo modelo. Em todos os estudos, a redução de GLT-1/GLAST foi

associada ao aumento dos níveis de GFAP, indicando que a redução no número de células gliais é improvável para explicar os níveis persistentemente baixos de proteína (Ohgoh *et al.*, 2002). É válido pontuar que além dos neurônios, as células T, macrófagos, e células gliais ativadas, têm potencial para sintetizar e liberar glutamato. Como outros modelos de EM, como a EAE, contam com o rompimento da BHE e infiltração de macrófagos e linfócitos, e maior demanda de mediadores inflamatórios, o glutamato adicional liberado por estas células podem fornecer um suprimento elevado e contínuo do neurotransmissor, além de induzir maior liberação pelas células gliais (Mandolesi *et al.*, 2015). Dessa forma, é possível que, neste modelo, a contribuição periférica eleve de tal forma os níveis de glutamato extracelular, podendo resultar em *down-regulation* dos transportadores de glutamato glial como uma resposta adaptativa ou compensatória para tentar atenuar os efeitos do excesso de glutamato e proteger o tecido neural (Mandolesi *et al.*, 2013; Levite, 2017; Mohebiany e Schneider, 2013). Já no modelo de CPZ, onde podemos avaliar a participação de células gliais, é possível que os mecanismos subjacentes à *down-regulation* dos transportadores de glutamato sejam diferentes daqueles na EAE. Acredita-se que a elevação glutamatérgica gere o aumento de subunidades GluN2B e proteínas de densidade pós-sináptica para a inserção destes receptores (Araújo *et al.*, 2017) Assim, a excitotoxicidade na CPZ gera uma alta demanda para remoção do glutamato, refletida no aumento dos níveis de GLAST. A cronicidade da lesão levaria ao ajuste homeostático, como forma de lidar com o aumento do neurotransmissor, em um mecanismo que parece ser dependente exclusivamente dos astrócitos e que pode auxiliar na recuperação do dano tecidual (Azami *et al.*, 2013; Vallejo-Illarramendi *et al.*, 2006; Mandolesi *et al.*, 2015).

Adicionalmente, o tratamento com PLK (0,1 mg/kg) elevou ainda mais os níveis de GLAST, quando comparado ao grupo CPZ. Descrevemos aqui de forma pioneira, a regulação do transportador de glutamato astrocitário GLAST pelo tratamento com PLK (0,1 mg/kg). São ausentes estudos que abordem o envolvimento do fármaco na recaptção do glutamato em modelo de EM. Supomos, que o aumento nos níveis de GLAST reflita algo além do ajuste homeostático visto na CPZ. É bem estabelecido que a sinalização via NF-κB pode ajustar a transcrição de recaptadores de glutamato (Sitcheran *et al.*, 2005; Bañuelos *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2023). Liu *et al.* (2022) relataram, a partir de modelo de depressão induzida, que o tratamento com PLK reduz a translocação nuclear de NF-κB, o que conseqüentemente preveniu a perda de GLT-

1. No mesmo estudo, relataram que o aumento CysLT são dependentes da ativação de transcrição nuclear kappaB (NFkB) no hipocampo, concomitante à sinalização glutamatérgica. Desta forma, o tratamento com PLK suprime o aumento de NF-kB nuclear, regulando os níveis de GLT-1 (Tang *et al.*, 2014). Como NF-kB também pode afetar a transcrição de GLAST, acreditamos que o tratamento com PLK pode prevenir a perda de GLAST no modelo CPZ de forma indireta através de NF-kB (Bañuelos *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2023). O aumento de GLAST pode ser prevaletido, ainda que de forma indireta, pela prevenção da desmielinização e regulação negativa de IL-6, que reduz o agravamento da lesão. Camundongos transgênicos para IL-6 astrocitário, tiveram reduzida expressão de GLAST no cerebelo (Gruol *et al.*, 2020). Dessa forma, demonstramos de forma inédita a regulação do transportador de glutamato astrocitário GLAST, pelo tratamento com PLK (0,1 mg/kg). Nossos resultados podem indicar que o fármaco tem o potencial de regular positivamente a recaptção de glutamato no córtex visual, através da elevação dos níveis de GLAST no modelo. Em conjunto, os achados da modulação sináptica pelo PLK sugerem um potencial efeito neuroprotetor do fármaco no modelo CPZ, abrindo portas para novas investigações sobre seus mecanismos de ação e aplicabilidade.

Os resultados promissores do tratamento com PLK na dose de 0,1 mg/kg, diante das alterações causadas pelo CPZ, nos levaram a considerar se uma dose mais alta poderia ser ainda mais benéfica. Ou *et al.* (2016) relataram efeitos positivos na maturação de Olig ao administrar injeções de PLK a 0,1 mg/kg, repetidas a cada 12 horas. Dessa forma, considerando os resultados promissores do tratamento preventivo com essa concentração, optamos por aumentar a dose para 0,2 mg/kg. Nosso objetivo foi verificar se o efeito do medicamento poderia ser influenciado pela dose no modelo de intoxicação por CPZ.

Ao dobrar a dose, observamos a prevenção aos danos funcionais ao sistema visual, conforme observado com a dose inicial. No entanto, ao analisarmos o perfil de desmielinização decorrente do tratamento, notamos que a dose de 0,2 mg/kg não foi capaz de prevenir a desmielinização ou a ativação astrogliar, quando comparado a CPZ. Apesar do aumento na dose não ter evitado a desmielinização e a gliose, ele conseguiu prevenir danos à visão de profundidade, indicando que o comprometimento visual observado na CPZ não depende exclusivamente da desmielinização.

7. CONCLUSÃO

Avaliar os efeitos e a eficácia de novos fármacos na complexa fisiopatologia da EM é de suma importância, dada a lacuna terapêutica existente para tratar de forma ampla os aspectos da doença. O reposicionamento de medicamentos já utilizados clinicamente emerge como uma estratégia promissora para facilitar sua incorporação em novos tratamentos.

Nossos resultados oferecem *insights* sobre o potencial terapêutico do PLK frente ao modelo animal de EM, a partir de um modelo de desmielinização que conta com a participação de células residentes do SNC. Além disso, este estudo abre novas portas para pesquisas adicionais e estratégias que visam compreender os mecanismos pelos quais o PLK protege o sistema visual contra os danos desmielinizantes, inflamatórios e sinápticos no modelo de CPZ.

Nosso estudo demonstrou que o PLK previne o comprometimento do sistema visual no modelo CPZ em diferentes contextos. Relatamos aqui, que o tratamento com PLK, nas doses 0,1 mg/kg e 0,2 mg/kg, em concomitante com a intoxicação por CPZ, previne os déficits visuais associados a visão de profundidade através do teste comportamental *Visual Cliff*. Adicionalmente, relatamos que a dose 0,1 mg/kg do PLK previne parcialmente a desmielinização na camada IV e no córtex visual, enquanto PLK na dose 0,2 mg/kg não induz alterações. Este resultado indica que a prevenção do comprometimento funcional da visão, não depende exclusivamente da mielinização.

Demonstramos também que o PLK regula a resposta inflamatória no modelo CPZ ao reduzir significativamente a citocina pró-inflamatória IL-6, cuja expressão é aumentada na EM. Esse resultado sugere que o PLK pode exercer efeitos diversos sobre a patologia da doença, indiretamente, por meio da redução da IL-6. No entanto, observamos que o tratamento com PLK nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg não afetou os níveis das células astrocitárias ou microgliais reativas no modelo utilizado. Apesar da densidade celular não variar, observamos uma redução dos processos astrocitários no tratamento com PLK (0,1 mg/kg) sugerindo uma possível modulação no perfil de atividade astrocitária. Entretanto, mais análises precisam ser feitas para validar a hipótese.

Após descrever o efeito do tratamento com PLK na desmielinização e inflamação, analisamos as alterações sinápticas no modelo CPZ. Ao investigar sinapse excitatórias,

não obtivemos uma variação nos níveis de GluN2A, corroborando os dados da literatura em análises no sistema visual (Araujo *et al.*, 2017). Analisando a subunidade GluN2B, observamos uma variação morfológica entre os grupos. Enquanto no grupo CPZ a marcação se assemelhou a processos astrocitários, no grupo PLK parecia estar presente nos axônios e dendritos. O tratamento com PLK (0,1 mg/kg) reduziu significativamente a marcação para a subunidade GluN2B no modelo CPZ.

Visando avaliar a contribuição do tratamento com o PLK frente à homeostase do glutamato no modelo, avaliamos a recaptação de glutamato astrocitário. Descrevemos que os níveis de GLAST são altamente regulados no tratamento com PLK (0,1 mg/kg), o que pode exercer efeitos na homeostase do glutamato que é altamente comprometida no modelo.

Por fim, descrevemos aqui que enquanto a dose de 0,2 mg/kg de PLK não exibiu efeitos na desmielinização e ativação astrocitária, a dose de 0,1 mg/kg de PLK foi eficaz em prevenir grande parte das alterações descritas no modelo. Dessa forma, sugerimos que 0,1 mg/kg é a concentração ideal para o uso do fármaco no modelo animal de EM.

Pela primeira vez, demonstramos que o tratamento com PLK reduz aspectos inflamatórios, desmielinizantes e sinápticos no modelo animal de EM, pela contribuição de células gliais. Observamos que a influência direta ou indireta nos astrócitos, microglia, oligodendrócitos e neurônios resulta em efeitos benéficos quando administrado na concentração de 0,1 mg/kg de PLK. Embora os mecanismos subjacentes a essas modulações ainda não estejam totalmente esclarecidos, o antagonismo de CysLTR medeia grande parte dos efeitos. Esses achados indicam o potencial terapêutico do PLK como uma abordagem promissora no tratamento da EM, destacando a importância de mais pesquisas para compreender completamente seus mecanismos de ação e otimizar seu uso clínico.

8. REFERÊNCIAS

- ABDI, M. *et al.* **Metformin therapy attenuates pro-inflammatory microglia by inhibiting NF- κ B in cuprizone demyelinating mouse model of multiple sclerosis.** *Neurotoxicity research*, v. 39, p. 1732-1746, 2021.
- ABSINTA, M., *et al.* **A lymphocyte–microglia–astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis.** *Nature*, v. 597, n. 7878, p. 709-714. 2021.
- A Federação Internacional de Esclerose Múltipla. **Atlas da EM**, 3ª Edição. 2020.
- AHMADI, H., *et al.* **Association between single nucleotide polymorphisms rs12722489 and multiple sclerosis in Iranian patients with multiple sclerosis.** *Curr J Neurol.*, v. 19, n. 1, p. 26–31. 2020 Jan 5.
- AN, J. *et al.* **Temporal and spatial dynamics of astroglial reaction and immune response in cuprizone-induced demyelination.** *Neurotoxicity Research*, v. 37, p. 587-601. 2020.
- ANGELINI, J.; *et al.* **The Distribution of GPR17-Expressing Cells Correlates with White Matter Inflammation Status in Brain Tissues of Multiple Sclerosis Patients.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, 2021.
- ARAÚJO, S. E. S., *et al.* **Inflammatory demyelination alters subcortical visual circuits.** *J Neuroinflammation*, v. 14, n. 162, 2017.
- ARAÚJO, S. E. S. **Fatores inflamatórios e desmielinização promovem plasticidade retinofugal via modulação colinérgica e glutamatérgica.** Tese. (Doutorado em Biofísica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- ARGAW, A. T., *et al.* **VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown.** *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 106, n. 6, p. 1977-82. 2009.
- AZAMMI, T., *et al.* **Progressive demyelination and astrocytosis in the central nervous system of transgenic mice with chronic expression of interleukin-6 in the astrocytes.** *Neuroscience Letters*, 556, 237–242. 2013
- BABURINA, Y.L., KRESTININA, O.V. e AZARASHVILI, T.S. **2',3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase (CNPase) as a target in neurodegenerative diseases.** *Neurochem. J.* v. 7, p. 1–15. 2013.
- BAECHER-ALLAN, C., KASKOW, B. J. e WEINER, H. L. **Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy.** *Neuron.*, v. 97, n. 4, p. 742-768. 2018 Feb 21.
- BAER, A. S., *et al.* **Myelin-mediated inhibition of oligodendrocyte precursor differentiation can be overcome by pharmacological modulation of Fyn-RhoA and protein kinase C signalling.** *Brain*, v. 132, n. 2, p. 465-481. 2009.
- BALCER, L. J., *et al.* **Self-reported visual dysfunction in multiple sclerosis: results from the 25-Item National Eye Institute Visual Function Questionnaire (VFQ-25).** *Multiple Sclerosis Journal*, v. 6, n. 6, p. 382-385. 2000.

- BAO, Y., *et al.* **NMDAR-dependent somatic potentiation of synaptic inputs is correlated with β amyloid-mediated neuronal hyperactivity.** *Translational Neurodegeneration*, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2021.
- BAR-OR, A., *et al.* **Epstein–Barr virus in multiple sclerosis: theory and emerging immunotherapies.** *Trends in molecular medicine*, v. 26, n. 3, p. 296-310. 2020.
- BASSI, M. S., *et al.* **Interleukin-6 Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Tissue Damage Compensation in Multiple Sclerosis.** *Neurorehabilitation and Neural Repair*, v. 33, n. 10, p. 825-835. 2019.
- BELLINGACCI, L., *et al.* **Synaptic Dysfunction in Multiple Sclerosis: A Red Thread from Inflammation to Network Disconnection.** *Int J Mol Sci.*, v. 22, n. 18, p. 9753. 2021 Sep 9.
- BIERHANSL, L., *et al.* **Thinking outside the box: non-canonical targets in multiple sclerosis.** *Nat Rev Drug Discov*, v. 21, n. 8, p. 578-600. 2022
- BJORNEVIK, K., *et al.* **Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis.** *Science*, v. 375, p. 296-301. 2022.
- BRÜCK, W. **Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis.** *Journal of neurology*, v. 252, p. v10-v15. 2005.
- BUSCHMANN, J. P., *et al.* **Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination.** *Journal of Molecular Neuroscience*, v. 48, p. 66-76. 2012.
- BYSTRÖM, S., *et al.* **Affinity proteomic profiling of plasma, cerebrospinal fluid, and brain tissue within multiple sclerosis.** *Journal of proteome research*, v. 13, n. 11, p. 4607-4619, 2014.
- CAPRA, V., *et al.* **Cysteinyl-leukotriene receptor 1 antagonism prevents experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Brain*, v. 138, Pt 2, p. 380-395. 2015
- CHANG, A., *et al.* **Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis.** *N Engl J Med.* v. 346, n. 3, p. 165-73. 2002 Jan 17.
- CHEN, F., *et al.* **Preventive effect of genetic knockdown and pharmacological blockade of CysLT1R on lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficit and neurotoxicity in vivo.** *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 60, p. 255-269. 2017.
- CHEN, K., *et al.* **Expression of cysteinyl leukotriene receptor GPR17 in eosinophilic and non-eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps.** *Asian Pac J Allergy Immunol.*v. 36, n. 2, p. 93-100. 2018 Jun.
- CHEN, Y., *et al.* **The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination.** *Nat Neurosci.*, v. 12, n. 11, p. 1398-406. 2009 Nov.
- CHEN, Z., *et al.* **Microglial displacement of inhibitory synapses provides**

neuroprotection in the adult brain. *Nat Commun*, v. 5, p. 4486. 2014.

CHU, Li- sheng, *et al.* **Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice 1.** *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 27, n. 3, p. 282-288. 2006.

CIANA, P., *et al.* **The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl- leukotrienes receptor.** *The EMBO journal*, v. 25, n. 19, p. 4615-4627. 2006.

COPPI, E., *et al.* **UDP-glucose enhances outward K(+) currents necessary for cell differentiation and stimulates cell migration by activating the GPR17 receptor in oligodendrocyte precursors.** *Glia.*, v. 61, n. 7, p. 1155-71. 2013 Jul.

CORREALE, J., *et al.* **Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment.** *Brain*, v. 140, n. 3, p. 527–546, 2017.

COUTINHO COSTA, V. G., *et al.* **Central nervous system demyelinating diseases: glial cells at the hub of pathology.** *Front Immunol.*, v.14, e: 1135540. 2023 May 16.

CREE, B. A. C., *et al.* **Secondary Progressive Multiple Sclerosis: New Insights.** *Neurology.* v. 97, n. 8, p. 378-388. 2021 Aug 24.

CRUZ, S. A. A. C. **Marcadores de astrócitos neurotóxicos e neuroprotetores modulados por fingolimode em modelo de desmielinização inflamatória por cuprizona.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2023. Em fase de pré-publicação.

DAHAM J, *et al.* **Economic Burden of Multiple Sclerosis in Low- and Middle-Income Countries: A Systematic Review.** *Pharmacoeconomics*, v.39, n. 7, p. 789-807. 2021 Jul.

DAHLMANN, M., *et al.* **Glial Glutamate Transporter-Mediated Plasticity: System xc-/xCT/SLC7A11 and EAAT1/2 in Brain Diseases.** *Front. Biosci, Landmark Ed*, v. 28, n. 3, p. 57. 2023.

DE PÁDUA, A. C. A. P. **Alterações Sinápticas e Mecanismos Astrocitários Associados em Modelo de Esclerose Múltipla e após Tratamento com o Fingolimode.** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2023. Em fase de pré-publicação.

DIMITRIOU, N.G., *et al.* **Treatment of Patients with Multiple Sclerosis Transitioning Between Relapsing and Progressive Disease.** *CNS Drugs*, v. 37, p. 69–92. 2023.

DING, Q., *et al.* **Cysteinyl leukotriene receptor 1 partially mediates brain cryoinjury in mice.** *Acta Pharmacol Sin.*, v. 28, n. 7, p. 945-52. 2007 Jul.

DING, Q. *et al.* **Cysteinyl leukotriene receptor 1 is involved in N-methyl-D-aspartate- mediated neuronal injury in mice.** *Acta Pharmacol Sin.*, 27, n. 12, p.

1526-36. 2006 Dec.

DOBSON, R. e GIOVANNONI, G. **Multiple sclerosis—a review.** European journal of neurology, v. 26, n. 1, p. 27-40, 2019.

DOLCETTI, E., *et al.* **Emerging Role of Extracellular Vesicles in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis.** Int. J. Mol. Sci., v. 21, p. 7336. 2020.

DUTTA, R. *et al.* **Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients.** Ann Neurol., n. 59, v. 3, p. 478-89. 2006 Mar.

DZIEDZIC, A., *et al.* **The GPR17 Receptor-A Promising Goal for Therapy and a Potential Marker of the Neurodegenerative Process in Multiple Sclerosis.** Int J Mol Sci., v. 21, n 5, p. 1852. 2020 Mar 8.

ELLIOTT, Melanie B., *et al.* **Hypertonic saline attenuates tissue loss and astrocyte hypertrophy in a model of traumatic brain injury.** Brain research, v. 1305, p. 183-191. 2009.

ESCARTIN, C. *et al.* **Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions.** Nature neuroscience, v. 24, n. 3, p. 312-325. 2021.

ESPÍRITO-SANTO, S. **Astrocytes as a target for Nogo-A and implications for synapse formation in vitro and in a model of acute demyelination.** Glia, v. 69, n. 6, p. 1429-1443. 2021 Jun.

EUGSTER, H. P., *et al.* **IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis.** Eur J Immunol., v. 28, n. 7, p. 2178-87. 1998 Jul.

FAISSNER, S., *et al.* **Progressive multiple sclerosis: from pathophysiology to therapeutic strategies.** Nat Rev Drug Discov, v. 18, p. 905–922. 2019.

FANG, S. H. *et al.* **Increased expression of cysteinyl leukotriene receptor-1 in the brain mediates neuronal damage and astrogliosis after focal cerebral ischemia in rats.** Neuroscience, v. 140, n. 3, p. 969-979. 2006.

FATTORI, E. *et al.* **IL- 6 expression in neurons of transgenic mice causes reactive astrocytosis and increase in ramified microglial cells but no neuronal damage.** European Journal of Neuroscience, v. 7, n. 12, p. 2441-2449. 1995.

FOX, M. W. **The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse.** Anim Behav., v. 13, n. 2, p. 232-3. 1965 Apr-Jul.

FRIESE, M., SCHATTLING, B. e FUGGER, L. **Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis.** Nat Rev Neurol, v. 10, p. 225–238. 2014.

FRIESE, M. A. **Widespread synaptic loss in multiple sclerosis.** Brain, v. 139, n. 1, p. 2–4. 2016.

GE, Q. F. *et al.* **Activation of 5-lipoxygenase after oxygen-glucose deprivation is partly mediated via NMDA receptor in rat cortical neurons.** J Neurochem., v. 97,

n. 4, p. 992-1004. 2006 May.

- GE, Q. F. *et al.* **Activation of 5- lipoxygenase after oxygen- glucose deprivation is partly mediated via NMDA receptor in rat cortical neurons.** Journal of neurochemistry, v. 97, n. 4, p. 992-1004. 2006.
- GELOSA, P. *et al.* **Cysteinyl leukotrienes as potential pharmacological targets for cerebral diseases.** Mediators of inflammation, v. 2017. 2017.
- GITLER, D. *et al.* **Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses.** Journal of Neuroscience, v. 24, n. 50, p. 11368-11380. 2004.
- GOTTLIEB, M. e MATUTE, C. **Expression of ionotropic glutamate receptor subunits in glial cells of the hippocampal CA1 area following transient forebrain ischemia.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, v. 17, n. 3, p. 290-300. 1997.
- GRAHAM, S. L. e KLISTORNER, A. **Afferent visual pathways in multiple sclerosis: a review.** Clinical & experimental ophthalmology, v. 45, n. 1, p. 62-72, 2017.
- GRUOL, D. L. *et al.* **Alcohol and IL-6 alter expression of synaptic proteins in cerebellum of transgenic mice with increased astrocyte expression of IL-6.** Neuroscience, v. 442, p. 124-137.2020.
- GUERRERO, B. L. e SICOTTE, N. L. **Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe?** Front Immunol., v. 11, n. 374. 2020 Mar 20.
- GUIDO, W. **Development, form, and function of the mouse visual thalamus.** Journal of neurophysiology, v. 120, n. 1, p. 211-225. 2018.
- GUILLAUD, L.; SETOU, M. e HIROKAWA, N. **KIF17 dynamics and regulation of NR2B trafficking in hippocampal neurons.** Journal of Neuroscience, v. 23, n. 1, p. 131-140. 2003.
- HAINZ, N. *et al.* **Probenecid-treatment reduces demyelination induced by cuprizone feeding.** Journal of Chemical Neuroanatomy, v. 85, p. 21-26, 2017.
- HANAFY, K. A. e SLOANE, J. A. **Regulation of remyelination in multiple sclerosis.**FEBS Lett., v. 585, n. 23, p. 3821-8. 2011.
- HAROON, E., MILLER, A. e SANACORA, G. **Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders.** Neuropsychopharmacol, v. 42, p. 193–215. 2017.
- HAROON, F. *et al.* **Gp130 - Dependent Astrocytic Survival Is Critical for the Control of Autoimmune Central Nervous System Inflammation.**J Immunol, v. 186, n. 11, p. 6521–6531. 1 June 2011.
- HAUSER, S. L. e CREE, B. A. C. **Treatment of Multiple Sclerosis: A Review.** Am J Med., v. 133, n. 12, p. 1380-1390.e2. 2020 Dec.
- HEALY, L. M. *et al.* **The role of glial cells in multiple sclerosis disease progression.** Nature Reviews Neurology, v. 18, n. 4, p. 237-248. 2022.

- HENNEN, S., *et al.* **Decoding signaling and function of the orphan G protein-coupled receptor GPR17 with a small-molecule agonist.** *Sci Signal.*, v. 6, n. 298, e: :ra93. 2013 Oct 22.
- HRISTOV, M.; NANKOVA, A. e ANDREEVA-GATEVA, P. **Alterations of the glutamatergic system in diabetes mellitus.** *Metabolic Brain Disease*, p. 1-13. 2023.
- HU, J. L. *et al.* **Dopamine D1 receptor-mediated NMDA receptor insertion depends on Fyn but not Src kinase pathway in prefrontal cortical neurons.** *Molecular Brain*, v. 3, p. 1-14, 2010.
- IACOBUCCI, G. J. e POPESCU, G. K. **NMDA receptors: linking physiological output to biophysical operation.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 18, n. 4, p. 236-249. 2017.
- 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, 2003.
- IOVINO, L., TREMBLAY, M. E. e CIVIERO, L. **Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells.** *J Pharmacol Sci.*, v. 144, n. 3, p. 151-164. 2020 Nov.
- ISHINAGA, H. *et al.* **Pranlukast inhibits NF- κ B activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells.** *Pharmacology*, v. 73, n. 2, p. 89-96. 2005.
- ITO, D. *et al.* **Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1.** *Molecular brain research*, v. 57, n. 1, p. 1-9, 1998.)
- JHELMUM, P. *et al.* **Ferroptosis mediates cuprizone-induced loss of oligodendrocytes and demyelination.** *Journal of Neuroscience*, v. 40, n. 48, p. 9327-9341. 2020.
- JL, S. *et al.* **Retinal neurodegeneration in a mouse model of green-light-induced myopia.** *Experimental Eye Research*, v. 223, p. 109208, 2022.
- JÜRGENS, T. *et al.* **Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis.** *Brain*. v. 139, parte 1, p. 39-46, 2016.
- KEAM, S.J., LYSENG-WILLIAMSON, K.A. e GOA, K.L. **Pranlukast.** *Drugs*, v. 63, p. 991–1019. 2003.
- KIM, S. *et al.* **Functional antagonism of sphingosine- 1- phosphate receptor 1 prevents cuprizone- induced demyelination.** *Glia*, v. 66, n. 3, p. 654-669, 2018.
- KLINEOVA, S. e LUBLIN, F. D. **Clinical Course of Multiple Sclerosis.** *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 8, n. 9, a028928. 2018.
- KOBELT G, *et al.* **New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe.** *Mult Scler.*, v. 23, n. 8, p. 1123-1136. 2017.

- KREBS, C. *et al.* **Functional NMDA receptor subtype 2B is expressed in astrocytes after ischemia in vivo and anoxia in vitro.** *Journal of Neuroscience*, v. 23, n. 8, p. 3364-3372, 2003.
- LAMPRON, A., *et al.* **Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 212, n. 4, p. 481-495. 2015. LEAMEY, C. A
- LECCA, D.; ABBRACCHIO, M. P. & FUMAGALLI, M. **Purinergic receptors on oligodendrocyte progenitors: promising targets for myelin repair in multiple sclerosis?** *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 629618. 2021.
- LEE, D. *et al.* **Temporal changes in in vivo glutamate signal during demyelination and remyelination in the corpus callosum: a glutamate-weighted chemical exchange saturation transfer imaging study.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 24, p. 9468, 2020.
- LEE, H. G., WHEELER, M. A e QUINTANA, F. J. **Function and therapeutic value of astrocytes in neurological diseases.** *Nat Rev Drug Discov.*, v. 21, n. 5, p. 339-358. 2022.
- LETELLIER, M. *et al.* **Astrocytes regulate heterogeneity of presynaptic strengths in hippocampal networks.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 113, n. 19, p. E2685-E2694, 2016.
- LEVITE, M. **Glutamate, T cells and multiple sclerosis.** *Journal of Neural Transmission*, v. 124, n. 7, p. 775-798. 2017.
- LIDDELOW, S. A. *et al.* **Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia.** *Nature*, v. 541, n. 7638, p. 481-487, 2017.
- LIN, J. *et al.* **Hippocampal CysLT1R knockdown or blockade represses LPS-induced depressive behaviors and neuroinflammatory response in mice.** *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 38, n. 4, p. 477-487. 2017.
- LINNERBAUER, M., WHEELER, M. A. & QUINTANA, F. J. **Astrocyte Crosstalk in CNS Inflammation.** *Neuron.*, v. 108, n. 4, p. 608-622. 2020 Nov 25.
- LIU, X. *et al.* **Deficiency of astrocyte CysLT1R ameliorates depression-like behaviors in mice by modulating glutamate synaptic transmission.** *Neurobiol Dis.*, v. 175, e: 105922. 2022 Dec.
- LLOYD, A. F. e MIRON, V. E. **The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system.** *Nat Rev Neurol*, v. 15, p. 447–458. 2019.
- LOPEZ, J. A., *et al.* **Pathogenesis of autoimmune demyelination: from multiple sclerosis to neuromyelitis optica spectrum disorders and myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody- associated disease.** *Clinical & Translational Immunology*, v. 10, n. 7, e1316. 2021.
- LUCHICCHI, A.; PREZIOSA, P. & HART, B. T'. **Editorial: "Inside-Out" vs "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis.** *Front Cell Neurosci*, v. ;15,

n. 666529. 2021 Mar 1.

MAHMOUD, S. *et al.* **Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release.** *Cells*, v. 8, n. 2, p. 184. 2019 Feb 20.

MANDOLESI, G. *et al.* **Interleukin-1 β alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis.** *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 29, p. 12105-12121. 2013.

MANDOLESI, G. *et al.* **Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis.** *Nature reviews. Neurology*, v. 11, n. 12, p. 711–724. 2015.

MANRESA-ARRAUT, A., *et al.* **RhoA Drives T-Cell Activation and Encephalitogenic Potential in an Animal Model of Multiple Sclerosis.** *Front Immunol.*,v. 9, p. 1235. 2018 May 31.

MARENNA, S. *et al.* **Visual evoked potentials to monitor myelin cuprizone-induced functional changes.** *Frontiers in Neuroscience*, v. 16, p. 820155. 2022.

MARQUES, C. F.; MARQUES, M. M. e JUSTINO, G. C. **Leukotrienes vs. Montelukast—activity, metabolism, and toxicity hints for repurposing.** *Pharmaceuticals*, v. 15, n. 9, p. 1039. 2022.

MARTINEZ, B. e PELOW, P. V. **Protective effects of pharmacological therapies in animal models of multiple sclerosis: a review of studies 2014–2019.** *Neural Regeneration Research*, v. 15, n. 7, p. 1220. 2020.

MAYO, L. *et al.* **Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation.** *Nat Med*, v. 20, p. 1147–1156. 2014.

MCMURRAN, C. E.; ZHAO, C. e, FRANKLIN, R. J. M. **Toxin-Based Models to Investigate Demyelination and Remyelination.** *Methods Mol Biol*, v. 1936, p. 377-396, 2019.

MEY, G. M.; DESILVA, T. M. **Utility of the visual system to monitor neurodegeneration in multiple sclerosis.** *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 16, p. 1125115. 2023.

MIRSHAFIEY, A. e JADIDI-NIARAGH, F. **Immunopharmacological role of the leukotriene receptor antagonists and inhibitors of leukotrienes generating enzymes in multiple sclerosis.** *Immunopharmacology and immunotoxicology*, v. 32, n. 2, p. 219-227, 2010.

MOHEBIANY, A. N. e SCHNEIDER, R. **Glutamate Excitotoxicity in the cerebellum mediated by IL-1 β .** *Journal of Neuroscience*, v. 33, n. 47, p. 18353-18355. 2013.

MOREL, A. *et al.* **The increased level of COX-dependent arachidonic acid metabolism in blood platelets from secondary progressive multiple sclerosis patients.** *Molecular and cellular biochemistry*, v. 420, p. 85-94. 2016.

MORGAN, B. P.; GOMMERMAN, J. L. e RAMAGLIA, V. **An “outside-in” and**

- “inside-out” consideration of complement in the multiple sclerosis brain: lessons from development and neurodegenerative diseases.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 14, p. 600656. 2021.
- MORI, F., *et al.* **Interleukin-1 β Promotes Long-Term Potentiation in Patients with Multiple Sclerosis.** *Neuromol Med*, v. 16, p. 38–51. 2014.
- MOUSSIANAS, L. *et al.* **Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis.** *Nature Genetics*, v. 47, n. 10, p. 1107-1113. 2015 Oct.
- MURÚA, S. R., FAREZ, M. F. e QUINTANA, F. J. **The Immune Response in Multiple Sclerosis.** *Annu Rev Pathol.*, v. 17, p. 121-139. 2022 Jan 24.
- MUSELLA, A., G., *et al.* **Interplay between age and neuroinflammation in multiple sclerosis: Effects on motor and cognitive functions.** *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 161. 2015
- MUSELLA, A., *et al.* **Linking synaptopathy and gray matter damage in multiple sclerosis.** *Multiple Sclerosis Journal*, v. 22, n. 2, p. 146-149. 2016.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary for CID 4887, Pranlukast. Retrieved January 25, 2024 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pranlukast>.
- OHGOH, Makoto *et al.* **Altered expression of glutamate transporters in experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Journal of neuroimmunology*, v. 125, n. 1-2, p. 170-178, 2002.
- OLECHOWSKI, C. J. *et al.* **A diminished response to formalin stimulation reveals a role for the glutamate transporters in the altered pain sensitivity of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).** *Pain*, v. 149, n. 3, p. 565-572. 2010.
- OLIVARES-BAÑUELOS, T. N.; CHÍ-CASTAÑEDA, D. e ORTEGA, A. **Glutamate transporters: Gene expression regulation and signaling properties.** *Neuropharmacology*, v. 161, p. 107550. 2019.
- OSTKAMP, P. *et al.* **Sunlight exposure exerts immunomodulatory effects to reduce multiple sclerosis severity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, n. 1, e: 201845711. 2021.
- OUELLETTE, R. *et al.* **7 T imaging reveals a gradient in spinal cord lesion distribution in multiple sclerosis.** *Brain*, v. 143, n. 10, p. 2973-2987, 2020.
- OU *et al.*, **Olig2-Targeted G-Protein-Coupled Receptor Gpr17 Regulates Oligodendrocyte Survival in Response to Lysolecithin-Induced Demyelination.** *J Neurosci.*, v. 36, n. 41, p. 10560-10573. 2016 Oct 12.
- PAOLETTI, P.; BELLONE, C. e ZHOU, Q. **NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease.** *Nature Reviews Neuroscience*, v. 14, n. 6, p. 383-400, 2013.
- PAOLETTI, P. e NEYTON, J. **NMDA receptor subunits: function and pharmacology.**

Current opinion in pharmacology, v. 7, n. 1, p. 39-47, 2007.

PAOLETTI, P. **Molecular basis of NMDA receptor functional diversity.** European Journal of Neuroscience, v. 33, n. 8, p. 1351-1365. 2011.

PERDAENS, O. e PESCH, V. V. **Molecular mechanisms of immunosenescence and inflammaging:** Relevance to the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis. Frontiers in neurology, v. 12, p. 811518. 2022.

PETKOVIĆ, F. *et al.* **Astrocyte- targeted production of interleukin- 6 reduces astroglial and microglial activation in the cuprizone demyelination model:** Implications for myelin clearance and oligodendrocyte maturation. Glia, v. 64, n. 12, p. 2104-2119. 2016.

PETRALIA, R. S. *et al.* **Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations.** Neuroscience, v. 167, n. 1, p. 68-87, 2010.

PROCACCINI, C. *et al.* **Animal models of multiple sclerosis.** European journal of pharmacology, v. 759, p. 182-191, 2015.

PURVES, D. *et al.* **Neurociência**, 4ª edição, São Paulo: ARTMED®, 2010.

RAFFAELE, S.; BOCCAZZI, M. e FUMAGALLI, M. **Oligodendrocyte dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis: mechanisms and therapeutic perspectives.** Cells, v. 10, n. 3, p. 565, 2021.

RAMAGLIA, V. *et al.* **Complement-associated loss of CA2 inhibitory synapses in the demyelinated hippocampus impairs memory.** Acta Neuropathologica, v. 142, n. 4, p. 643-667, 2021.

ROCHE, K. W. *et al.* **Molecular determinants of NMDA receptor internalization.** Nature neuroscience, v. 4, n. 8, p. 794-802, 2001.

ROSSI, S. *et al.* **Inflammation inhibits GABA transmission in multiple sclerosis.** Multiple Sclerosis Journal, v. 18, n. 11, p. 1633-1635, 2012.

ROUFAGALAS, I. *et al.* **Novel cell-based analysis reveals region-dependent changes in microglial dynamics in grey matter in a cuprizone model of demyelination.** Neurobiology of Disease, v. 157, p. 105449. 2021.

ROVIRA, A., AUGER, C. & ALONSO, J. **Magnetic resonance monitoring of lesion evolution in multiple sclerosis.** Ther Adv Neurol Disord, v. 6, n. 5, p. 298-310. 2013 Sep).

RUIZ, F.; VIGNE, S. e POT, C. **Resolution of inflammation during multiple sclerosis.** Semin Immunopathol, v. 41, n. 6, p. 711-726, 2019.

SCHWARZ, K. e SCHMITZ, F. **Synapse Dysfunctions in Multiple Sclerosis.** Int J Mol Sci, v. 24, n. 2, p. 1639. 2023 Jan 13.

SCOTT, L. J. **Siponimod: A Review in Secondary Progressive Multiple Sclerosis.** CNS Drugs, v. 35, n. 1, p. 133. 2021.

- SEKYI, M. T. *et al.* **Alleviation of extensive visual pathway dysfunction by a remyelinating drug in a chronic mouse model of multiple sclerosis.** *Brain Pathology*, v. 31, n. 2, p. 312-332. 2021.
- SEN, M. K., *et al.* **The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis.** *Glia*, v. 70, n. 7, p. 1215-1250. 2022 Jul.
- SEN, M. K. *et al.* **Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 107, p. 23-46. 2019.
- SEYEDSADR, M. S. e INEICHEN, B. V. **Gpr17, a Player in Lysolecithin-Induced Demyelination, Oligodendrocyte Survival, and Differentiation.** *J Neurosci*. v. 37, n. 9, p. 2273-2275, 2017.
- SHI, Q. J., *et al.* **HAMI 3379, a CysLT2R antagonist, dose- and time-dependently attenuates brain injury and inhibits microglial inflammation after focal cerebral ischemia in rats.** *Neuroscience*, v. 291, p. 53-69. 2015 Apr 16.
- SHOBEIRI, Parnian *et al.* **IL-6 and TNF- α responses to acute and regular exercise in adult individuals with multiple sclerosis (MS): a systematic review and meta-analysis.** *European Journal of Medical Research*, v. 27, n. 1, p. 185. 2022.
- SIMKINS, T. J.; DUNCAN, G. J. e BOURDETTE, D. **Chronic Demyelination and Axonal Degeneration in Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Therapeutic Implications.** *Curr Neurol Neurosci Rep*. Apr 2021.
- SITCHERAN, R. *et al.* **Positive and negative regulation of EAAT2 by NF- κ B: a role for N- myc in TNF α - controlled repression.** *The EMBO journal*, v. 24, n. 3, p. 510-520. 2005.
- SKRIPULETZ, T., *et al.* **Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination.** *Brain*, v. 136, n. 1, p. 147-67. 2013 Jan.
- STAMPANONI, B. M. *et al.* **Interleukin-6 Disrupts Synaptic Plasticity and Impairs Tissue Damage Compensation in Multiple Sclerosis.** *Neurorehabilitation and Neural Repair*, v. 33, n. 10, p. 825-835. 2019.
- STAMPANONI *et al.* **Neurophysiology of synaptic functioning in multiple sclerosis.** *Clin Neurophysiol*, v. 128, n. 7, p. 1148-1157. 2017 Jul.
- STERN, S. *et al.* **RhoA drives actin compaction to restrict axon regeneration and astrocyte reactivity after CNS injury.** *Neuron*, v. 109, n. 21, p. 3436-3455. e9, 2021.
- STOJANOVIC, I. R.; KOSTIC, M. e LJUBISAVLJEVIC, S. **The role of glutamate and its receptors in multiple sclerosis.** *Journal of Neural Transmission*, v. 121, p. 945-955. 2014.
- STYS, P., *et al.* **Will the real multiple sclerosis please stand up?** *Nat Rev Neurosci*,

v. 13, p. 507–514. 2012.

SÜHS, K. W. *et al.* **Cytokine regulation by modulation of the NMDA receptor on astrocytes.** *Neuroscience letters*, v. 629, p. 227-233, 2016.

SULKOWSKI, G., *et al.* **Modulation of Glutamate Transport and Receptor Binding by Glutamate Receptor Antagonists in EAE Rat Brain.** *PLoS ONE*, v. 9, n. 11, e:113954. 2014.

SUN, Y., YU, H. e GUAN, Y. **Glia Connect Inflammation and Neurodegeneration in Multiple Sclerosis.** *Neurosci. Bull.*, n. 39, p. 466–478. 2023.

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. 2013.

TAMEH, A. A., *et al.* **Regional regulation of glutamate signaling during cuprizone-induced demyelination in the brain.** *Ann Anat.*, v. 195, n. 5, p. 415-23. 2013 Oct.

TANG, S. S.; *et al.* **Protective effect of pranlukast on A β 1–42-induced cognitive deficits associated with downregulation of cysteinyl leukotriene receptor 1.** *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 17, n. 4, p. 581–592, 2014.

THERON, A. J., *et al.* **Cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonists as modulators of innate immune cell function.** *Journal of immunology research*, v. 2014, ID 608930, p. 16.2014.

TITUS, H. E., *et al.* **Pre-clinical and Clinical Implications of "Inside-Out" vs. "Outside-In" Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis.** *Front Cell Neurosci.*, v. 14, e: 599717. 2020 Oct 27.

TOMARI, S. *et al.* **Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, attenuates allergen- specific tumour necrosis factor alpha production and nuclear factor kappa B nuclear translocation in peripheral blood monocytes from atopic asthmatics.** *Clinical & Experimental Allergy*, v. 33, n. 6, p. 795-801. 2003.

TZAMERET, A., *et al.* **Evaluation of visual function in Royal College of Surgeon rats using a depth perception visual cliff test.** *Visual Neuroscience.*, v. 36, e: 002. 2019.

URBANSKI, M. M., *et al.* **Acute and chronic demyelinated CNS lesions exhibit opposite elastic properties.** *Sci Rep.*, v. 9, n. 1, p. 999. 2019 Jan 30.

VALENTIN-TORRES A, *et al.* **Blockade of sustained tumor necrosis factor in a transgenic model of progressive autoimmune encephalomyelitis limits oligodendrocyte apoptosis and promotes oligodendrocyte maturation.** *J Neuroinflammation.*, v. 15, n. 1, p. 121. 2018 Apr 24.

VALLEJO-ILLARRAMENDI, A. *et al.* **Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis.** *Neurobiology of disease*, v. 21, n. 1, p. 154-164. 2006.

- VERCELLINO, M. *et al.* **Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, v. 66, n. 8, p. 732-739.2007.
- VERKHRATSKY, A. e CHVÁTAL, A. **NMDA receptors in astrocytes.** Neurochemical research, v. 45, n. 1, p. 122-133, 2020.
- VERKHRATSKY, A. e KIRCHHOFF, F. **NMDA receptors in glia.** The Neuroscientist, v. 13, n. 1, p. 28-37, 2007.
- VERKHRATSKY, A. e NEDERGAARD, M. **Physiology of Astroglia.** Physiol Rev, v. 98, n. 1, p. 239-389. 2018 Jan 1.
- VIEIRA, M. *et al.* **Regulation of NMDA glutamate receptor functions by the GluN2 subunits.** Journal of neurochemistry, v. 154, n. 2, p. 121-143, 2020.
- WALK, R. D.; GIBSON, E.J.; TIGHE, T. J. **Behavior of light-and dark-reared rats on a visual cliff.** Science, v. 126, n. 3263, p. 80-81. 1957.
- WALTON, C. *et al.* **Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition.** Mult Scler. v.26, n. 14, p. 1816-1821, 2020.
- WANG, L. *et al.* **Antiasthmatic drugs targeting the cysteinyl leukotriene receptor 1 alleviate central nervous system inflammatory cell infiltration and pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis.** The Journal of Immunology, v. 187, n. 5, p. 2336-2345. 2011.
- WOLF, S. A.; BODDEKE, H. W. G. M. e KETTENMANN, H. **Microglia in physiology and disease.** Annual review of physiology, v. 79, p. 619-643, 2017.
- YANG, X. *et al.* **Long-lasting somatic modifications of convergent dendritic inputs in hippocampal neurons.** Cerebral Cortex, v. 30, n. 3, p. 1436-1446, 2020.
- YEH, W. Z. *et al.* **Immunoregulatory effects and therapeutic potential of vitamin D in multiple sclerosis.** British journal of pharmacology, v. 177, n. 18, p. 4113-4133. 2020.
- YOKOYAMA, A., *et al.* **Effect of pranlukast, a leukotriene receptor antagonist, in patients with severe asthma refractory to corticosteroids.**J Asthma.,v 35, n. 1, p. 57-62. 1998.
- YU, G. L. *et al.* **Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist, protects against chronic ischemic brain injury and inhibits the glial scar formation in mice.** Brain Res., v1053, n. 1-2, p. :116-25. 2005 Aug 16.
- YU, S. *et al.* **Neuroprotective effects of CysLTR antagonist on Streptococcus pneumoniae- induced meningitis in rats.** Experimental and Therapeutic Medicine, v. 24, n. 1, p. 1-10. 2022.
- ZHAN, J., *et al.* **The Cuprizone Model: dos and do Nots.** Cells, v. 9, n.4, p. 843 2020.
- ZHANG, H. *et al.* **Huperzine—A Improved Animal Behavior in Cuprizone-Induced Mouse Model by Alleviating Demyelination and Neuroinflammation.** International

Journal of Molecular Sciences, v. 23, n. 24, p. 16182. 2022.

ZHANG, L. H. e WEI, E. Q. **ONO-1078 reduces NMDA-induced brain injury and vascular cell adhesion molecule-1 expression in rats.** Acta Pharmacol Sin, v. 26, p. 435–440. 2005.

ZHANG, W. P. *et al.* **Expression of cysteinyl leukotriene receptor 1 in human traumatic brain injury and brain tumors.** Neurosci Lett., v. 363, n. 3, p. 247-51. 2004 Jun 17.

ZHANG, X. *et al.* **HAMI 3379, a CysLT2 receptor antagonist, attenuates ischemia-like neuronal injury by inhibiting microglial activation.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 346, n. 2, p. 328-341. 2013.

ZHANG, X. *et al.* **Regulation of rotenone-induced microglial activation by 5-lipoxygenase and cysteinyl leukotriene receptor 1.** Brain research, v. 1572, p. 59-71. 2014.

ZHOU, Z. *et al.* **EphA4/ephrinA3 reverse signaling mediated downregulation of glutamate transporter GLAST in Müller cells in an experimental glaucoma model.** Glia, v. 71, n. 3, p. 720-741, 2023.

ZOUPPI, L. *et al.* **Selective vulnerability of inhibitory networks in multiple sclerosis.** Acta Neuropathologica, v. 141, n. 3, p. 415-429, 2021.