

ALTERAÇÕES SINÁPTICAS E MECANISMOS ASTROCITÁRIOS ASSOCIADOS
EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E APÓS TRATAMENTO COM
FINGOLIMODE

ANA CAROLINA DE PÁDUA ALPINO PEREIRA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil

Março/2023

ALTERAÇÕES SINÁPTICAS E MECANISMOS ASTROCITÁRIOS ASSOCIADOS
EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E APÓS TRATAMENTO COM
FINGOLIMODE

ANA CAROLINA DE PÁDUA ALPINO PEREIRA

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

Orientadoras: Dra. Sheila Espírito Santo Araújo

Co-orientadora: Dra. Cíntia Monteiro de Barros

Colaboradores: Saulo Cruz, Greice Pires, Daniel Areias e Dr. Henrique
Mendonça.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil

Março/2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P436

Pereira, Ana Carolina de Pádua Alpino.

ALTERAÇÕES SINÁPTICAS E MECANISMOS ASTROCITÁRIOS ASSOCIADOS EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E APÓS TRATAMENTO COM FINGOLIMODE / Ana Carolina de Pádua Alpino Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

37 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2023.

Orientadora: Sheila Espírito Santo Araújo.

Coorientadora: Cintia Monteiro de Barros.

1. Esclerose Múltipla. 2. Sinaptopatia. 3. Fingolimode. 4. Sinaptogênese. 5. Cuprizona. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

Ana Carolina de Pádua Alpino Pereira

ALTERAÇÕES SINÁPTICAS E MECANISMOS ASTROCITÁRIOS ASSOCIADOS
EM MODELO DE ESCLEROSE MÚLTIPLA E APÓS TRATAMENTO COM
FINGOLIMODE

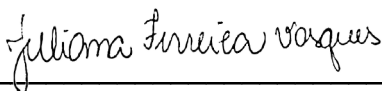
Dissertação apresentada ao
Centro de Biociências e
Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Biociências e
Biotecnologia

Aprovada em 1º de março de 2023


Banca examinadora:



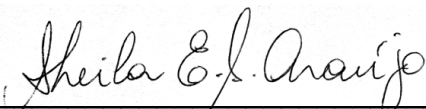
Glauber Monteiro Dias, D. Sc. (UENF)



Juliana Vasques, D. Sc. (UFRJ)



Luana da Silva Chagas, D. Sc. (UFF)



Sheila Espírito Santo Araújo, D. Sc (UENF) – orientadora



Cíntia Monteiro de Barros, D. Sc (UFRJ) – co-orientadora

O essencial é invisível aos olhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Saulo por estar comigo nos momentos mais difíceis, por não me deixar desistir e por segurar minha mão quando eu achei que desabaria.

Agradeço infinitamente a minha filha Laura, pois tudo isso é por ela. Obrigada por todos os sorrisos, carinhos e “Eu te amo” que vinham sempre na hora que eu mais precisava.

Agradeço às minhas orientadoras Sheila e Cíntia por me darem essa oportunidade e por estarem comigo do início ao fim.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Saulo (sim, meu marido), Bia, Daniel e os outros que estão chegando pelo apoio. Agradeço a Greice pelo suporte desde a iniciação científica.

Agradeço à todos os professores do LBCT, principalmente ao Renato e Serginho por me acolher e permitir que eu desempenhasse meu trabalho no laboratório de deles e é claro, agradeço pelos bons momentos de descontração também.

Agradeço à todos meus amigos do LBCT: Tâmara, Felipe, Pedro, Mileninha e tantos outros por rirem comigo e rirem de mim quando chorei. Com certeza, vocês foram essenciais para tornar esses dois anos mais leves. Obrigada à todos pelo carinho com Laurinha, ela assim como eu ama todos vocês.

Agradeço à minha mãe Daniela, ao meu tio Miguel e ao meu avô Piestch que mesmo de longe sei que torcem por mim.

Agradeço também à minha família motoqueiros pelos momentos de alegria, mesmo que esses tenham diminuído com a distância, sei que estão comigo, assim como estou com vocês.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.....	2
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Epidemiologia.....	6
1.2 Fisiopatologia da EM.....	7
1.3 Sinapses e Sinaptopatia.....	9
1.4 Astrócitos e Sinapses.....	11
1.5 Astrócitos na EM.....	13
1.6 Tratamentos para EM.....	14
1.7 Fingolimode.....	15
1.8 Intoxicação por cuprizona como modelo de estudo da EM.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Animais, alimentação com cuprizona e tratamento com Fingolimode.....	20
3.2 Obtenção de cortes histológicos.....	20
3.3 Imunofluorescência.....	21
3.4 Análises estatísticas.....	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 Fingolimode não reverte a desmielinização induzida pela cuprizona no córtex visual de camundongos.....	23
4.2 Sítios sinápticos totais são reduzidos no modelo de EM e Fingolimode restaura e/ou previne a sua eliminação.....	24
4.3 Sítios pós-sinápticos inibitórios são aumentados no modelo de CPZ e FING restaura/previne o aumento.....	26
4.4 Terminais sinápticos excitatórios corticais são aumentados no modelo de EM.....	26
4.5 O nível de ativação dos interneurônios inibitórios não é alterado no modelo de EM e após tratamento com FING.....	27
4.6 Em modelo de EM os astrócitos parecem exibir um perfil mais anti-sinaptogênico.....	28
5. DISCUSSÃO.....	31
6. CONCLUSÃO.....	35
7. REFERÊNCIAS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

EM: Esclerose Múltipla

SNC: Sistema Nervoso Central

ABEM: Associação Brasileira de Esclerose Múltipla

SB: Substância Branca

SC: Substância Cinzenta

GABA: Ácido γ -aminobutírico

EAE: Encefalomielite autoimune experimental

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa

IL-1 β : Interleucina-1 beta

GluR: Receptores de glutamato

BHE: Barreira hemato encefálica

TSP: Trombospondinas

NMDAR: N-Metil-D-Aspartato

AMPAR: amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazolpropionato

SPARC: Proteína secretada ácida e rica em cisteína

A1: Astrócitos neurotóxicos

A2: Astrócitos neuroprotetores

FDA: Food Drug Administration

EUA: Estados Unidos da América

DMT: Terapia oral modificadora da doença

S1P: Esfingosina 1-fosfato

S1PR: Receptor de esfingosina 1-fosfato

TNF α : Fator de necrose tumoral alfa

IL-1 β : Interleucina

IFN γ : Interferon gama

CPZ: Cuprizona

CNT: Controle

FING: Fingolimode

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

PFA: Paraformaldeído

NGL: Núcleo Geniculado Lateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa da fase aguda da doença, onde há a infiltração de células imune periféricas auto reativas contra a bainha de mielina que secretam citocinas pró-inflamatórias que culminam na degradação da mielina e reatividade de células imune residentes. Fonte: Steinman, 2003.

Figura 2: Imagem ilustrativa do possível mecanismo que culmina na perda sináptica na Esclerose Múltipla, evidenciando a excitotoxicidade levada pelo acúmulo de glutamato nas fendas sinápticas e o prejuízo dos astrócitos de realizarem a recaptação dos mesmos. Fonte: Mandolesi, 2015.

Figura 3: Imagem representativa da estrutura da sinapse tripartida, mostrando terminais pré e pós-sinápticos (azul) e astrócito (vermelho). Fonte: Perea, 2008.

Figura 4: Imagem ilustrativa da formação de sinapses talamocorticais induzidas pela Hevina. Astrócitos (amarelo) secretando Hevina, uma proteína pró-sinaptogênica, que promove a estabilização das conexões trans sinápticas entre neurexinas pré-sinápticas (laranjas) e neuroligandinas pós-sinápticas (lilás) para a formação de sinapses talamocorticais. Fonte: Singh et al., 2016.

Figura 5: Imagem ilustrativa referente ao mecanismo de ação do fármaco fingolimode. Evidenciando que sua ligação nos receptores S1P leva a internalização dos mesmos, dessa forma, impedindo a saída de linfócitos dos linfonodos. Fonte: Adaptado de Cartier e Hla, 2019.

Figura 6: Imagem representativa do modelo experimental usado no presente trabalho.

Figura 7: Imunofluorescência para MBP no córtex visual de camundongos. a esquematização da localização do córtex visual no encéfalo de camundongos com ênfase nas camadas corticais, tendo destaque a camada IV, que é nossa região de interesse. **b, d, f** imagens de imunofluorescência para MBP (vermelho) e DAPI (azul) nos três grupos experimentais (CNT- CPZ - FING) no aumento de 10x mostrando toda região do córtex visual. **c, e, g** imagens de imunofluorescência para MBP e DAPI no aumento de 40x, evidenciando somente a camada IV do córtex visual. **h** gráfico da quantificação da densidade integrada da marcação de MBP no aumento de 10x nos três grupo experimentais (CNT n= 5; CPZ n= 5; FING n= 4). **i** gráfico da quantificação da densidade integrada da imunomarcção de MBP no aumento de 40x na camada IV do córtex visual (CNT n= 5; CPZ n= 5; FING n=4). *p<0,05; ns = não significativo; one-way ANOVA.

Figura 8: Imunofluorescência para o marcador sináptico sinaptofisina. **a, b, c** imagens de imunofluorescência para o marcador sináptico geral sinaptofisina (verde) na camada IV do córtex visual no aumento de 100x (CNT n= 3; CPZ n= 5; FING n= 3). **d** gráfico da quantificação dos punctas positivos para sinaptofisina nos três grupos experimentais. *p<0,05; ns = não significativo; one-way ANOVA.

Figura 9: Imunofluorescência o terminal pós-sináptico inibitório Gefirina. **a, b, c** imagens de imunofluorescência para o marcador estrutural pós-sináptico gefirina no aumento de 40x. **d** gráfico da quantificação da densidade integrada de gefirina (CNT n= 4; CPZ n=3; FING n=4). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

Figura 10: Imunofluorescência para o marcador pré-sináptico excitatório v-GLUT1. **a,b,c** imagens de imunofluorescência de células v-GLUT1 positivas no aumento de 100x. **d** Quantificação da densidade integrada da marcação positiva para v-GLUT1 (CNT n= 3; CPZ n=2; FING n=3). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

Figura 11: Imunofluorescência da co-marcação de v-GLUT1 e GAD67. **a,b,c** Imagens de imunofluorescência para co-marcação dos terminais pré-sinápticos excitatórios positivos para v-GLUT1 e para interneurônios inibitórios positivos para GAD67. **d** Quantificação da densidade de marcação da co-localização de punctas positivas para v-GLUT1/GAD67 (CNT n= 3; CPZ n=2; FING n=3). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

Figura 12: Imunofluorescência para fatores pró e anti-sinaptogênicos astrocitários, Hevina e SPARC, respectivamente. **a,d,g** imagens de imunofluorescência para o marcador astrocitário GFAP. **j** quantificação da densidade de marcação de GFAP no aumento de 40x (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **b,e,h** imagens de imunofluorescência para o fator anti-sinaptogênico SPARC. **k** quantificação da densidade de marcação para SPARC (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **c,f,i** imagens de imunofluorescência da co-localização de células GFAP/SPARC positivas. **o** gráfico da quantificação da co-localização GFAP/SPARC positivas (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **l,m,n** imagens de imunofluorescência para o fator pró-sinaptogênico hevina. **p** quantificação dos punctas marcados para hevina (CNT n= 1; CPZ n=3; FING n=2). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença inflamatória e desmielinizante do SNC, ainda sem cura, que induz a diversos prejuízos, inclusive visuais. Recentemente, a sinaptopatia foi descrita como parte da fisiopatologia da EM, podendo ocorrer de modo independente da desmielinização, mas os mecanismos envolvidos ainda são pouco conhecidos. Astrócitos são um dos reguladores chave da formação e função sináptica através da secreção de fatores. Eles correspondem também a um dos elementos primários e marcantes nos sítios de lesão da EM. Uma das opções de tratamento utilizada é o fingolimode, um imunossupressor que atua na via do receptor de esfingosina fosfato, o qual é expresso em diversas células no SNC, inclusive nos astrócitos. Diante disso, nos propomos a investigar as alterações sinápticas no córtex visual de modelo de EM e os mecanismos astrocitários associados, bem como sua modulação pelo fingolimode. Para isso, utilizamos um modelo animal que mimetiza a EM, induzido pela droga cuprizona que leva à morte dos oligodendrócitos culminando em uma desmielinização inflamatória. Nossos resultados evidenciaram uma alteração sináptica no córtex visual de camundongos alimentados com CPZ, evidenciando uma perda SYN no grupo que mimetiza EM e uma restauração/proteção das sinapses após o tratamento FING. A imunomarcagem para sinapses inibitórias se mostrou aumentada no CPZ, sugerindo que a via visual estaria mais suprimida nesse contexto, justificando os déficits visuais da EM. v-GLUT1 (marcador de sinapse excitatória) foi encontrado aumentado no CPZ, sugerindo um aumento de sinapses corticais em detrimento da perda de sinapses talamocorticais que são as mais comuns na nossa região de interesse (camada IV), os mecanismos envolvidos por trás dessas alterações ainda precisam ser mais explorados. Mostramos também que a alimentação com CPZ e o tratamento com FING são capazes de alterar os perfis sinaptogênicos dos astrócitos, que podem estar associados com a perda sináptica encontrada em modelo de EM.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is an inflammatory and demyelinating disease of the CNS, still without cure, which induces several damages, including visual ones. Recently, synaptopathy was described as part of the pathophysiology of MS, and may occur independently of demyelination, but the procedures involved are still poorly understood. Astrocytes are one of the key regulators of synaptic formation and function through restriction factors. They also correspond to one of the primary and striking elements in MS lesion sites. One of the treatment options used is fingolimod, an immunosuppressant that acts on the sphingosine phosphate receptor pathway, which is expressed in several cells in the CNS, including astrocytes. Therefore, we propose to investigate the synaptic alterations in the visual cortex of an MS model and the associated astrocytic mechanisms, as well as their modulation by fingolimod. For this, we used an animal model that mimics MS, induced by the drug cuprizone, which leads to the death of oligodendrocytes, culminating in an inflammatory demyelination. Our results showed a synaptic change in the visual cortex of mice fed CPZ, evidencing a SYN loss in the group that mimics EM and a restoration/protection of synapses after FING treatment. Immunostaining for inhibitory synapses was increased in CPZ, suggesting that the visual pathway would be my surprises in this context, justifying the visual deficits in MS. v-GLUT1 (excitatory synapse marker) was found to be increased in CPZ, suggesting an increase in cortical synapses at the expense of loss of thalamocortical synapses that are the most common in our region of interest (layer IV), those involved behind these disorders still need to be more explorers. We also show that CPZ feeding and FING treatment are capable of altering the synaptogenic profiles of astrocytes, which may be associated with the synaptic loss found in the MS model.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença desmielinizante, autoimune e neurodegenerativa que afeta o Sistema Nervoso Central (SNC) (LASSMANN, et al., 2018). A principal marca da EM é a perda da bainha de mielina, que é uma capa lipídica sintetizada pelos oligodendrócitos funcionando como um isolante elétrico garantindo, dessa forma, eficiência na propagação do impulso nervoso (DI FILIPPO et al., 2018). A doença acomete cerca de 2,8 milhões de pessoas em todo o mundo, atingindo principalmente mulheres jovens, da faixa etária entre 20 e 40 anos (PONATH, et al., 2018; LIDDELOW, et al., 2017), provocando um impacto econômico no país, além do transtorno familiar. No Brasil, de acordo com os dados da Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM) de 2016, há uma estimativa de que haja em média cerca de 15 casos a cada 100 mil habitantes, ou seja, 40 mil brasileiros sofrem de EM. Sua etiologia ainda não é conhecida, contudo sabe-se que fatores ambientais, como tabagismo, infecções virais, má alimentação e baixa exposição ao sol estão associados à suscetibilidade à EM, justificando a alta prevalência de EM nos países longe da linha do equador. Alguns genes e alterações epigenéticas também já foram relacionados aos casos de EM (GARG; SMITH, 2015).

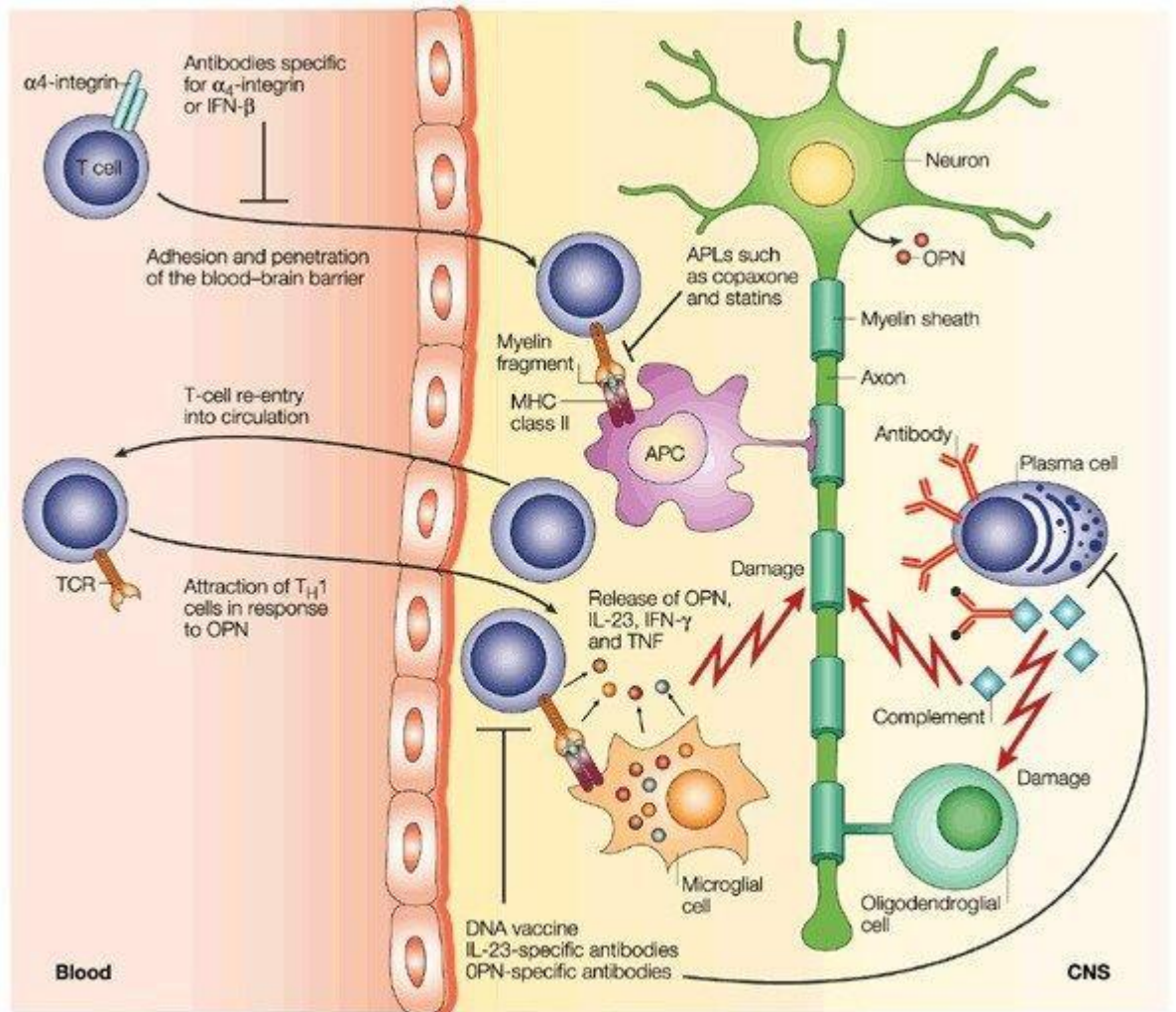
A ocorrência da EM leva a sérios prejuízos motores, cognitivos e sensoriais (LASSMANN et al, 2018; DI FILIPPO et al., 2018), incluindo disfunções no sistema visual, caracterizadas por perdas visuais momentâneas. Estima-se que cerca de 70% dos pacientes de EM apresentam prejuízos visuais (ARAÚJO et al., 2017; ALAVI et al., 2019), tornando essa região um alvo importante para estudo em contexto de doença. Clinicamente, a EM é dividida em três categorias: (1) Remitente-recorrente, comumente encontrada no começo da manifestação da doença (85% dos pacientes), caracterizada por períodos de surto onde há intensa infiltração imunoperiférica, presença de lesões desmielinizantes ativas e manifestações neurológicas, seguido de intervalos assintomáticos ou de remissão (MAKHANI & TREMLETT, 2021); (2) Secundária-progressiva, acomete cerca de 85% dos pacientes que já apresentaram quadros da EMRR, é caracterizada por pouca ou nenhuma infiltração imunoperiférica, piora crescente da incapacidade e degeneração neurológica com poucos ou nenhum episódios remissivos; (3)

Primária-progressiva, tipo mais incomum, e apresenta um constante aumento da incapacidade desde a primeira manifestação dos sintomas (SCOTT, 2021).

O que difere a EM de outras doenças desmielinizantes e neurodegenerativas é a presença de lesões perivasculares, que demonstram a quebra da Barreira Hematoencefálica (BHE) (LASSMANN et al., 2018). O diagnóstico pode ser realizado através da identificação de dessas lesões perivasculares através de exame de imageamento por ressonância magnética ou por meio de análise bioquímica do Líquor de pacientes para investigação de bandas oligoclonais (FILIPPI et al., 2018; KARUSSIS, 2014).

1.2 Fisiopatologia da EM

A fisiopatologia da EM é caracterizada pela infiltração de células imune periféricas, principalmente células T e B, auto reativas contra a bainha de mielina no SNC. Essas células auto reativas irão ativar outras residentes também contra mielina e deflagrar a destruição da bainha de mielina, inicialmente prejudicando a eficiência da transmissão dos impulsos nervosos e, por fim, podendo resultar em lesão axonal e neurodegeneração (DI FILIPPO et al., 2018; MANDOLESI et al., 2015). Nesse contexto, há também a ativação das células imunológicas centrais, como a microglia, que através da secreção de citocinas pró-inflamatórias ativam as células astrocitárias, retroalimentando positivamente a inflamação (ESPÍRITO-SANTO,S. et al., 2023) (Figura 1). Durante muitos anos, a EM era considerada uma patologia de substância branca (SB), por ser uma região rica em mielina. Contudo, evidências mais recentes mostram que além de afetar a SB do cérebro, a doença afeta também as regiões de substância cinzenta (SC) composta pelos corpos celulares dos neurônios e contatos sinápticos. Abrangendo, inclusive, regiões corticais relacionadas intimamente com os prejuízos causados pela EM, como a região cortical visual (MANDOLESI et al., 2015; ARAÚJO et al., 2017), tornando-a um alvo interessante para modelos de estudo de EM.



Nature Reviews | Immunology

Figura 1: Imagem representativa da fase aguda da doença, onde há a infiltração de células imune periféricas auto reativas contra a bainha de mielina que secretam citocinas pró-inflamatórias que culminam na degradação da mielina e reatividade de células imune residentes. Fonte: Steinman, 2003.

Recentemente, estudos proteômicos, neurotranscriptômicos, histológicos e neurofisiológicos reconheceram a disfunção e/ou perda sináptica, conhecida como sinaptopatia, implicada na fisiopatologia da EM (MANDOLESI et al., 2015; BONFIGLIO et al., 2017). Tais disfunções já foram observadas em estudos clínicos e em modelos animais como o modelo experimental de encefalomielite autoimune (EAE) e de cuprizona (CPZ), sendo estas intimamente relacionadas com os prejuízos neurológicos da doença (ESPÍRITO-SANTO et al., 2023). Interessantemente, alterações sinápticas são encontradas ao longo do curso da doença, podendo anteceder eventos desmielinizantes (MANDOLESI et al., 2015;

DI FILIPPO et al., 2018). Dessa forma, apesar da inflamação parecer corroborar com as anormalidades sinápticas, associadas ou não com as lesões desmielinizantes, os mecanismos envolvidos ainda não foram completamente elucidados (ESPÍRITO-SANTO, S. et al., 2023).

1.3 Sinapses e Sinaptopatia

Os neurônios são as células responsáveis pela transmissão da informação nervosa. Essa informação é dissipada por estruturas denominadas sinapses, formadas pela conexão de dois ou mais neurônios, onde a região final axonal de um neurônio, denominado terminal pré-sináptico, se conecta com o dendrito de outro neurônio, chamado de terminal pós-sináptico. E é através dessas conexões que há transmissão e propagação dos impulsos nervosos que podem ser de origem excitatória ou inibitória. A organização sináptica varia nas diferentes regiões cerebrais. Na via visual, especificamente, os prologamentos dos neurônios ganglionares da retina fazem conexão com neurônios talâmicos, que por sua vez enervam as camadas mais profundas do córtex visual (camadas IV e V), enquanto as camadas mais superficiais (I, II e III) recebem aferentes de neurônios de origem do próprio córtex visual (PURVES, 2010).

Nesse contexto, alguns estudos acessaram componentes sinápticos relacionados à estrutura e funcionamento perante a doença de EM e relataram perdas e disfunções, denominadas sinaptopatia. Além disso, também já descreveram um desbalanço entre as neurotransmissões excitatórias mediadas pelo glutamato e inibitórias, intermediadas pelo ácido γ -aminobutírico (GABA) (MOCK, E. et al., 2021; MANDOLESI et al., 2015).

Anteriormente, nosso grupo, demonstrou haver uma perda da marcação da proteína pré-sináptica vGLUT2 (marcador sináptico excitatório talamocortical) e ganho da imunomarcação para proteína pré-sináptica vGAT (marcador de vesículas de GABA) que é tipicamente encontrada em sinapses inibitórias na região subcortical visual talâmica de camundongos em modelo de EM (ARAÚJO et al., 2017), corroborando com os dados literários acerca da descompensação da razão entre excitação/inibição (E/I). Análises de tecidos *post mortem* em diferentes regiões do cérebro de pacientes com EM, também corroboram com esses achados, evidenciando um intenso decaimento de proteínas importantes para a

formação e funcionamento sináptico (KOOI et al., 2011), além da alteração nos níveis de proteínas pré e pós-sinápticas de sinapses excitatórias e inibitórias, apresentando perdas (HUISKAMP et al., 2022; MOCK, E. et al., 2021). Ademais, proteínas do complemento como C1q e C3 foram identificadas como mediadoras de perdas sinápticas no hipocampo de pacientes com EM, sugerindo a relação direta entre inflamação e perda sináptica (MICHAILEDIOU et al., 2015). Todavia, apesar de haverem vários dados demonstrando essa sinaptopatia, característica da EM, o mecanismo por qual ela ocorre ainda não é bem esclarecido.

Sendo assim, em condições homeostáticas normais as concentrações de neurotransmissores como GABA e glutamato, são regulados através da síntese, recaptção e degradação. E já foi observado que em pacientes com EM e em modelo de EAE, a maquinaria responsável por todos esses processos fica comprometida, afetando, a expressão de receptores envolvidos com esses neurotransmissores. Inclusive, altos níveis de glutamato já foram relatados em modelo de EAE e em cérebros de pacientes com EM (MANDOLESI et al, 2015). Nesse sentido, alguns mecanismos envolvidos com a sinaptopatia têm sido descritos. Astrócitos e microglia ativados em contexto de EM levam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, particularmente o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β), que já foram relacionados com a perturbação da neurotransmissão de pacientes com EM (ESPIRÍTO-SANTO,S et al, 2023). Além disso, a abundante acumulação de glutamato nas fendas sinápticas, resultado de uma liberação e recaptção ineficiente pelos astrócitos, causa estímulo excessivo dos receptores permeáveis a cálcio ativados pelo glutamato (GluRs) e maior inserção desses receptores na membrana pós-sináptica induzidos pela secreção de citocina inflamatórias. A superestimulação dos GluRs juntamente com a ineficácia da recaptção de glutamato nas fendas sinápticas, leva a uma desregulação homeostática de cálcio promovendo um microambiente de excitotoxicidade, dano neuronal e oligodendrocítico (MANDOLESI et al., 2015; ESPIRÍTO-SANTO,S et al., 2023). Dessa forma, o ambiente inflamatório causado pela EM diretamente e indiretamente, via alteração da atividade dos astrócitos, afetaria as sinapses (Figura 2).

A identificação da sinaptopatia como um das características marcantes da EM torna indispensável o estudo da doença em sítios enriquecidos sinapticamente,

como regiões de substância cinzenta (MANDOLESI et al., 2015). E, sabendo que as áreas visuais são frequentemente acometidas em indivíduos com EM e que anteriormente já detectamos uma desregulação sináptica em regiões subcorticais visuais (ARAÚJO et al., 2017), o estudo da sinaptopatia e seus mecanismos no córtex visual são de suma importância como a doença afeta o sistema visual dos pacientes.

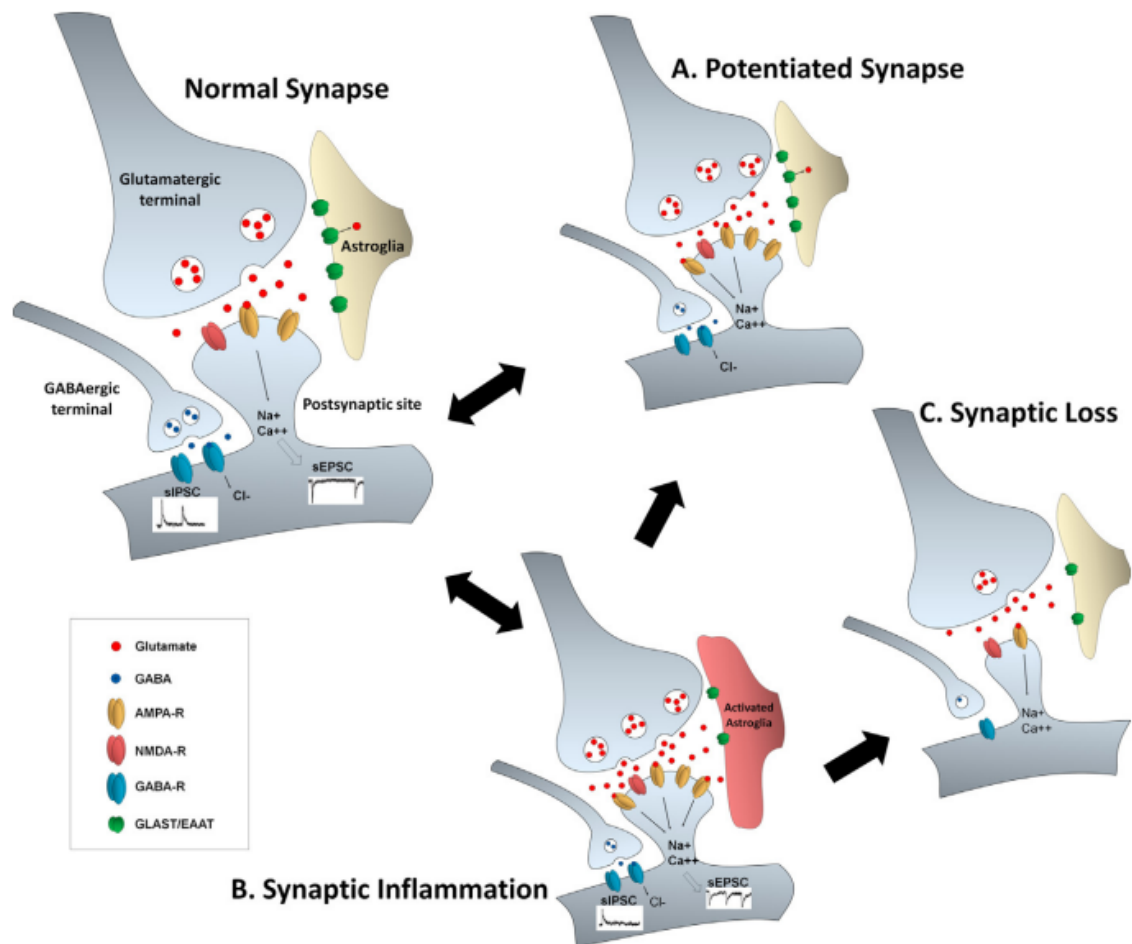


Figura 2: Imagem ilustrativa do possível mecanismo que culmina na perda sináptica na Esclerose Múltipla, evidenciando a excitotoxicidade levada pelo acúmulo de glutamato nas fendas sinápticas e o prejuízo dos astrócitos de realizarem a recaptação dos mesmos. Fonte: Mandolesi, 2015.

1.4 Astrócitos e sinapses

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no encéfalo de mamíferos e são responsáveis por diversas funções fisiológicas importantes nesse microambiente (ALLEN; EROGLU, 2017; BOSWORTH; ALLEN, 2017). Morfologicamente apresentam forma estrelada e vários processos. Parte destes

processos contribuem para a composição da BHE, favorecendo sua manutenção e função de barreira, restringindo a entrada de células imunes periféricas no SNC (PONATH; PARK; PITT, 2018). Além disso, os astrócitos possuem um importante papel neurotrófico e na regulação da homeostase do SNC (ALLEN; EROGLU, 2017), conseguindo entrar em íntimo contato com outras células gliais e com sinapses. Quando essa conexão ocorre entre os prolongamentos astrocitários e uma sinapse neuronal, que inclui um sítio pré- e um pós-sináptico, estabelece-se uma sinapse tripartida (PONATH; PARK; PITT, 2018). E embora os astrócitos não participem diretamente da transmissão de impulsos nervosos, eles regulam essa função através do controle do íon potássio (ALLEN; EROGLU, 2017) e da liberação e recaptção de neurotransmissores (PONATH; PARK; PITT, 2018) (Figura 3).

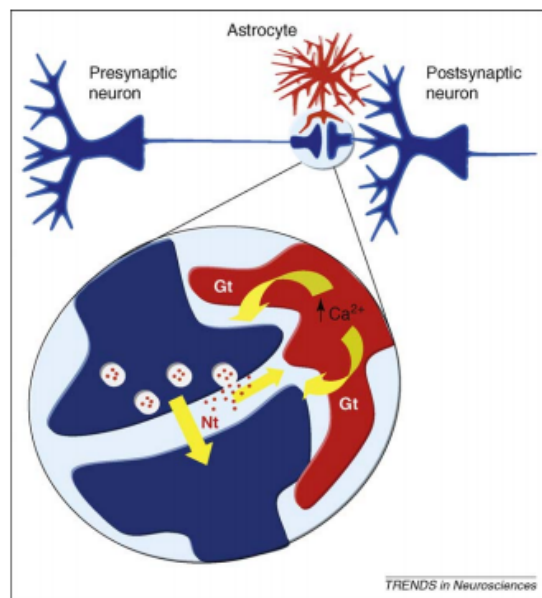


Figura 3: Imagem representativa da estrutura da sinapse tripartida, mostrando terminais pré e pós-sinápticos (azul) e astrócito (vermelho). Fonte: Perea, 2008.

Os astrócitos apresentam um papel de destaque na formação, função e atividade das sinapses, principalmente por meio do contato célula-célula ou pela liberação de fatores solúveis, capazes de regular positiva ou negativamente a formação de sinapses (RISHER; RISHER, 2020). Entre esses fatores, Hevina e Trombospondinas (TSP) 1 e 2 atuam na formação de sinapses silentes, contendo apenas receptores NMDAR; Glypican 4 e 6, na formação de sinapses maduras, contendo receptores NMDAR e AMPAR; e proteína secretada ácida e rica em cisteína (SPARC), que antagoniza a função da Hevina, prevenindo a formação de sinapses e induz a remoção de AMPAR das sinapses ativas (ALLEN; EROGLU,

2017; ESPÍRITO-SANTO, S et al., 2023;). Interessantemente, já foi descrito que a Hevina promove a formação de sinapses excitatórias talamocorticais através da organização de proteínas pré-sinápticas envolvidas com a liberação de glutamato (neurexina-1 α) e pós-sinápticas envolvidas com a inserção de NMDAR (neuroligina-1B). Dessa forma, promovendo uma ponte entre neurexina-1 α e a neuroligina-1B, duas isoformas que não interagem entre si e propiciam a formação de sinapses excitatórias talamocorticais (SINGH et al., 2016) (Figura 4). Destacando mais um vez a importância dos fatores sinaptogênicos secretados pelos astrócitos.

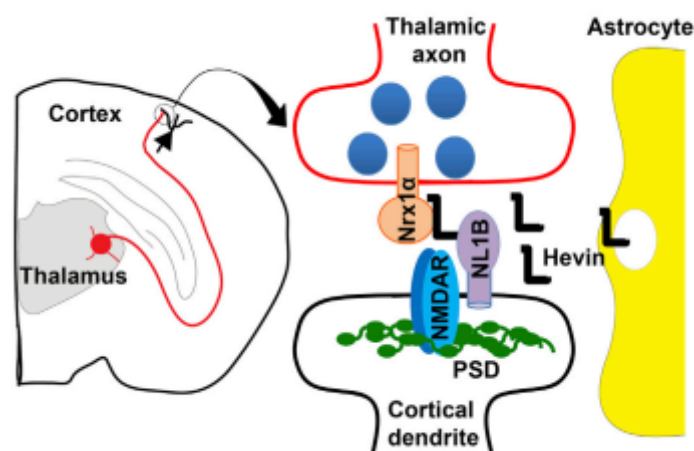


Figura 4: Imagem ilustrativa da formação de sinapses talamocorticais induzidas pela Hevina. Astrócitos (amarelo) secretando Hevina, uma proteína pró-sinaptogênica, que promove a estabilização das conexões trans sinápticas entre neurexinas pré-sinápticas (laranjas) e neuroliginas pós-sinápticas (lilás) para a formação de sinapses talamocorticais. Fonte: Singh et al., 2016.

1.5 Astrócitos na EM

Durante muito tempo os astrócitos foram considerados agentes secundários no curso da patologia de EM. Estes eram tidos somente como células de suporte que teriam uma reatividade passiva na tempestade imunológica causada no encéfalo durante a doença (LUDWIN, et al. 2016). Contudo, com os estudos dos últimos anos, foi comprovado um protagonismo astrocitário no decorrer deste processo inflamatório. Hoje, é sabido que os astrócitos são participantes ativos no desenvolvimento das lesões de EM (PONATH, et al. 2018), sendo responsáveis por eventos protetores e deletérios que ocorrem durante o curso da doença (LUDWIN, et al. 2016).

Estudos recentes, mostram que nas lesões da EM, assim como em áreas de pré-lesão, nota-se uma intensa ativação de células gliais, como astrócitos e microglia (BONFIGLIO et. al, 2017), sendo estas, consideradas células estratégicas na progressão da doença. Sabendo que as mesmas se mantêm ativas mesmo quando não há resposta imunológica periférica, elas se tornam um bom alvo para o estudo no mecanismo da EM.

Sob condições de lesão, os astrócitos podem assumir, simplificada, dois tipos de fenótipos dependendo do estímulo: neurotóxico (A1) ou neuroprotetor (A2), contribuindo para o reparo ou degeneração do SNC, respectivamente (PONATH, et al., 2018; SEN, et al., 2022). Estudo recente demonstrou que em cultura de astrócitos A1 é secretado um balanço de fatores solúveis menos favorável à sinaptogênese (LIDDELOW et. al, 2017), inclusive esse subtipo astrocitário parece regular positivamente genes relacionados com proteínas do complemento ligadas a opsonização de sinapses e a degeneração neural (SEN, et al., 2022). Já em contexto neuroprotetor já foi descrita a secreção de fatores tróficos que contribuem para o reparo neural, sináptico e na contenção da doença (LIDDELOW, et al., 2017; PONATH, et al., 2018; SEN, et al., 2022). Dessa forma, os astrócitos são células de destaque em contexto de doenças neuroinflamatórias, podendo estar relacionado a mecanismos chave para a compreensão e tratamento das mesmas.

1.6 Tratamentos para a EM

Até os dias de hoje não existe uma cura para a doença, de modo que os tratamentos proporcionam apenas um retardo na progressão dos sintomas. Os medicamentos disponíveis para Esclerose Múltipla buscam reduzir a atividade inflamatória e os surtos ao longo dos anos contribuindo para a redução do acúmulo de incapacidade durante a vida do paciente (BRINKMANN, et al., 2010). Dentre os com ação imunossupressora, destacam-se a azatioprina, a ciclofosfamida, o mitoxantrone, o methotrexate e a ciclosporina. Para o tratamento dos surtos, utiliza-se a pulsoterapia (administração de altas doses de medicamentos por curtos períodos de tempo) com corticoides sintéticos, o mais comum é o metilprednisolona. E dentre as novas terapias orais presentes no mercado, destacam-se o Fingolimode, Cladribina, Laquinimod, Teriflunomida, Fumarato de Dimetila (GHOLAMZAD, et al., 2018; ABEM, 2022). De acordo com a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla, estes medicamentos são distribuídos

gratuitamente pelo governo através de farmácias de dispensação de alto custo ou em centros públicos de referência do tratamento da EM mediante relatório médico que confirma a existência da doença (ABEM, 2022).

1.7 Fingolimode

Dentre as opções medicamentosas presentes para o tratamento de EM se encontra o Fingolimode (FING), um imunomodulador derivado da miriocina, um metabólito do fungo *Isaria sinclairii*. Historicamente, o medicamento começou a ser utilizado com o propósito de prevenir a rejeição do sistema imunológico após transplante renal, contudo, hoje, sua única utilização é para o tratamento de EM (McGINLEY & COHEN, 2021). O fármaco recebeu autorização do FDA (Food Drug Administration) dos EUA (Estados Unidos da América) em 2010 e foi a primeira terapia oral modificadora da doença (DMT) usada para as formas remitentes recorrentes da doença (ROY, et al., 2021).

O fingolimode é considerado um fármaco de segunda linha devido ao seu alto custo, contudo apresenta uma alta efetividade clínica na contenção dos sintomas inflamatórios em pacientes com EM (BONFIGLIO, et al., 2017). O fármaco é um ligante dos receptores de esfingosina-1-fosfato (S1PR) do subtipo S1P1R, S1P3R, S1P4R e S1P5R, que são comumente expressos na superfície celular de diversos tecidos (ROY, et al., 2021), inclusive em linfócitos e em células residentes do SNC, como os astrócitos que expressam majoritariamente os receptores S1P3 e S1P1, respectivamente. Seu mecanismo de ação leva a internalização e posterior degradação desses receptores, impedindo, dessa forma, a saída dos linfócitos dos linfonodos e sua migração para o SNC, bloqueando o ataque da mielina pelas células imunológicas. Interessantemente, o medicamento em sua forma bioativa, ou seja, fosforilada, é capaz de penetrar a BHE, tendo efeito nos receptores de S1P presentes nas células centrais (BRINKMANN, et al., 2010; BONFIGLIO, et al., 2017; ROSSI, et al., 2011) (Figura 5).

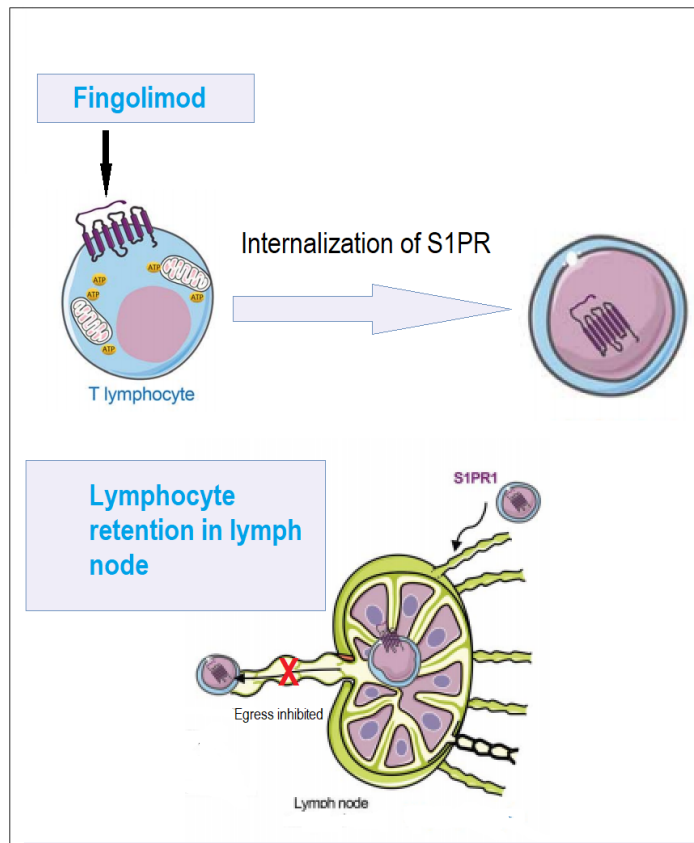


Figura 5: Imagem ilustrativa referente ao mecanismo de ação do fármaco fingolimode. Evidenciando que sua ligação nos receptores S1P leva a internalização dos mesmos, dessa forma, impedindo a saída de linfócitos dos linfonodos. Fonte: Adaptado de Cartier e Hla, 2019.

Estudos já demonstraram também que a via de S1P está diretamente relacionada com a retração e extensão de neuritos dos nervos periféricos (QUARTA, et al., 2017). Contudo, são raros os estudos que investigam a implicação do Fingolimode nas alterações sinápticas. Bonfiglio e colaboradores (2017) mostraram a ação do fingolimode na modulação da excitose de neurotransmissores de GABA e glutamato em camundongos com EAE. O medicamento conseguiu restaurar a excitose de glutamato aos níveis normais no córtex e hipocampo, mas não na medula espinal. Interessantemente, o fingolimode também conseguiu restaurar a excitose de GABA aos níveis normais na coluna espinal. Contudo, ainda não há estudo em áreas visuais. Dessa forma, mais estudos são requeridos para se entender o impacto do tratamento com Fingolimode nos aspectos sinápticos da EM.

Diante do exposto, nossa hipótese é que alterações no perfil sinaptogênico dos astrócitos corresponderia a um dos mecanismos envolvidos com as disfunções

sinápticas da EM e que o fingolimode reverteria esses efeitos pela modulação astrocitária.

1.8 Intoxicação por cuprizona como modelo de estudo da EM

Existem vários modelos experimentais que mimetizam a doença de EM, seja por mutações genéticas na mielina, pela indução do modelo inflamatório de EAE, desmielinização mediada por vírus ou pela desmielinização induzida por agentes tóxicos, como vemos nos modelos de lisolecitina e cuprizona (CPZ) (VEGA-RIQUER, et al., 2019; PALUMBO; PELLEGRINI, 2017). Apesar do modelo de EAE ser o mais utilizado, por conseguir mimetizar aspectos clássicos da doença, como a infiltração imune periférica autoimune, o modelo de cuprizona apresenta a desmielinização causada pela morte direta dos oligodendrócitos, sem que haja o recrutamento de células imune periféricas, como os linfócitos. Isso é vantajoso já que permite o estudo do SNC sem a interferência do sistema imune periférico (SEN, et al., 2022)

A cuprizona foi descrita pela primeira vez em em 1950 por Gustav Nilsson, quando percebeu que a cuprizona era um indicador sensível ao cobre. Nos anos seguintes, estudos relataram efeitos sistêmicos graves no sistema nervoso e órgãos periféricos, como no fígado de roedores (ZIRNGIBL, te al., 2022). No final da década de 1960, Willian Carlton descreveu crescimento reduzido de camundongos desmamados, paresia e gravidezes interrompidas após dieta com cuprizona. Arelado a isso, foi descrita a desmielinização seguida de inflamação mediada por astrócitos e microglia no cerebelo, medula e córtex (ZIRNGIBL, te al., 2022; VEGA-RIQUER, et al., 2019). Cuprizona é também referida como ciclohexilideno-hidrazida, é um quelante de cobre que tem como alvo muitas metaloenzimas envolvidas na atividade do citocromo oxidase dependente do cobre. Assim, apesar de não ser entendido exatamente seu mecanismo de ação, sua administração diminui a fosforilação oxidativa e produz degeneração especificamente em oligodendrócitos. Essa cascata de eventos culmina na desmielinização (VEGA-RIQUER, et al., 2019).

Canonicamente, hoje a cuprizona é utilizada na concentração de 0,2% durante 4 a 6 semanas para mimetizar a desmielinização aguda e cerca de 12 semanas para a desmielinização crônica. A alimentação de animais com cuprizona leva a uma intoxicação, que por sua vez, induz a apoptose da população de oligodendrócitos levando a uma grande desmielinização da substância branca do

SNC, que atinge seu ápice entre a 4-5 semanas de dieta (ZIRNGIBL, et al., 2022; VEGA-RIQUER, et al., 2019).

O modelo em questão, leva à ativação microglial e, conseqüentemente, astrocitária (SEN, et al., 2022). A microglia parece secretar algumas moléculas que medeiam os prejuízos causados por este modelo, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interferon gama (IFN γ), que retroalimentam positivamente ainda mais esse ambiente inflamatório e são capazes de modular o perfil astrogliar (VEGA-RIQUER, et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar as alterações sinápticas e os mecanismos sinaptogênicos astrocitários associados no córtex visual em modelo de EM e o efeito do tratamento com o fármaco fingolimode sobre esses parâmetros.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de marcadores sinápticos, correspondentes a sinapses totais (sinaptofisina), sinapses excitatórias (vGLUT1) e inibitórias (vGAT e geferina);
- Analisar através de marcadores para interneurônios inibitórios (GAD-67) e de terminais pré-sinápticos excitatórios (Vglut1) se as sinapses inibitórias estão sendo mais estimuladas ou inibidas;
- Acessar o perfil sinaptogênico dos astrócitos por meio da análise do fator pró-sinaptogênicos (Hevina) e anti-sinaptogênicos (Sparc).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e tratamento com cuprizona

Utilizamos camundongos suíços machos de 4-5 semanas de idade divididos em três grupos experimentais tratados por 5 semanas. O grupo controle (CNT) foi alimentado com ração comercial triturada e recebeu injeções intraperitoneais de solução veículo (salina + DMSO); o grupo cuprizona (CPZ), foi alimentado com ração normal triturada misturada à 0,2% de da droga cuprizona e recebeu as mesmas injeções do grupo CNT; e o grupo fingolimode (FINGO) foi alimentado com a mesma ração que o grupo CPZ, contudo recebeu injeções intraperitoneais do fármaco fingolimode na concentração de 1mg/kg diluído em DMSO e solução salina de acordo com descrito em protocolos anteriores. Os animais foram mantidos em ciclos de luz artificiais 12/12 horas, temperatura controlada e livre acesso a comida e a água. Os procedimentos animais foram aprovados pela CEUA em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, sob número de protocolo 037/18. Após o período de dieta com cuprizona, os animais foram eutanasiados por hipersedação através da injeção intraperitoneal de ketamina / xilazina. A maravalha e a carcaça dos animais foram descartados em lixo de material biológico (Figura 7).



Figura 6: Imagem representativa do modelo experimental usado no presente trabalho.

3.2 Obtenção dos cortes histológicos

Após eutanásia, os animais foram perfundidos intracardiacamente com

paraformaldeído 4% (PFA) para fixação tecidual e posterior dissecção do encéfalo. Logo após, os cérebros foram mantidos em PFA 4% por 24 horas na geladeira (4°C) e, posteriormente, crioprotetidos em solução de sacarose 20% em PBS 1X, também por 24 horas na geladeira. Após, emblocamos os encéfalos embebidos com o meio crioprotetor Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura) e, em seguida, congelados rapidamente por meio de nitrogênio líquido para posterior fatiamento em criostato. As fatias foram obtidas em criostato (Leica) na temperatura entre -20 e -25°C, com espessura de 14 µm e coletadas em lâminas de vidro previamente gelatinizadas.

3.3 Imunohistoquímica de fluorescência

As fatias foram submetidas a três lavagens com PBS 1X e submetidas a recuperação antigênica específica para tipo de marcação. Posteriormente, as fatias foram incubadas por 2 horas em solução de bloqueio contendo 3% de Albumina de Soro Bovino (BSA), 5% de Soro Normal de Cabra (NGS) e 0,3% de Triton diluídos em PBS 1X. Todas as marcações, exceto a que utilizamos goat anti-sparc utilizaram essa solução de bloqueio, pois para a mesma não utilizamos o NGS para evitar marcações inespecíficas devido a origem do anticorpo. Os anticorpos primários utilizados, foram rabbit anti-GFAP (1:350), goat anti-sparc (1:150), rat anti-hevina (1:50), mouse anti-sinaptofisina (1:200), rabbit anti-geferina (1:50), mouse anti-vGAT (1:500), mouse anti-GAD-67 (1:50), rabbit anti-vGLUT1 (1:200). Os cortes foram incubados over-night com os anticorpos primários na geladeira em câmara úmida. No dia seguinte o excesso de anticorpo é lavado com PBS 1X e as fatias são incubadas por mais duas horas com os anticorpos secundários conjugados a AlexaFluor ou FITC. Terminando esse período as fatias são lavadas novamente com PBS 1X e incubadas por sete minutos com DAPI e posterior lavagem do mesmo, finalizando o processo.

3.4 Análises estatísticas

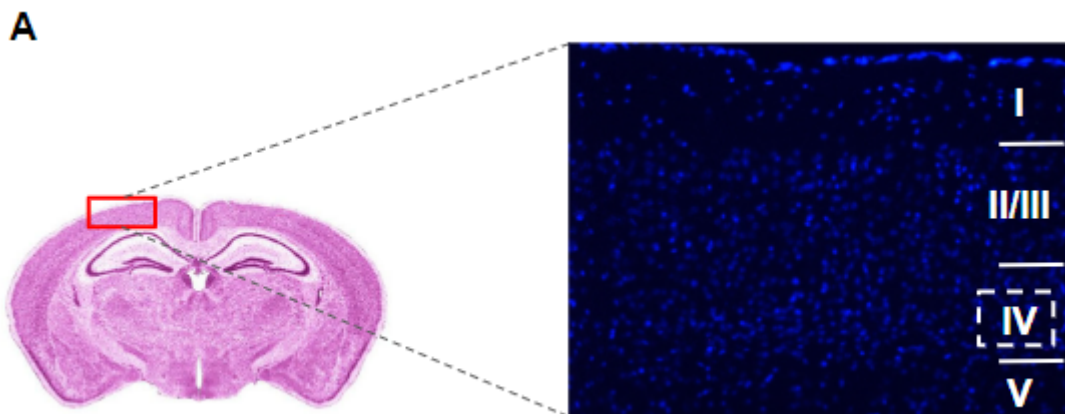
O processamento e quantificação das imagens foram feitos com o software FIJI (Image J) e os parâmetros quantificados para cada marcação foram: a densidade integrada de marcação (IntDen), que corresponde à intensidade de marcação por área marcada; e a contagem do número de punctas. Para cada corte, foram capturados em média 4 campos, considerando os valores médios entre os campos. Utilizamos o software GraphPad Prism 9 para fazer as análises, utilizando o teste One Way A-NOVA, com *post test* de Tukey para múltiplas

comparações. Os resultados são considerados estatísticos quando para p valor $<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Fingolimode não reverte a desmielinização induzida pela cuprizona no córtex visual de camundongos

Uma das marcas clássicas da EM é a perda da bainha de mielina (DI FILIPPO et al., 2018). Dessa forma, realizamos a imunomarcação para Proteína Básica de Mielina (MBP) e analisamos o córtex visual de camundongos. Como esperado, os níveis de MBP, no grupo CPZ é significativamente menor comparado ao CNT, atestando o mimetismo dessa característica da doença no grupo alimentado com CPZ (Figura 7-d) em nossa região de interesse (Figura 7-a). Além disso, o tratamento com o fármaco FING, não foi capaz de reverter a desmielinização provocada pelo CPZ (Figura 7-f). A desmielinização é evidenciada em todo córtex visual (Figura 7- b,d,f), porém é mais pronunciada nas camadas profundas (IV, V e VI) (Figura 7-c,e,g), que correspondem a regiões mais mielinizadas nos animais controles (Figura 7-c). Devido a isso, passamos a avaliar a camada IV nos experimentos seguintes. A quantificação da densidade de MBP no córtex visual inteiro (Figura 7-h) e na camada IV (Figura 7-i), confirmou a significativa diminuição de MBP validando nosso modelo experimental.



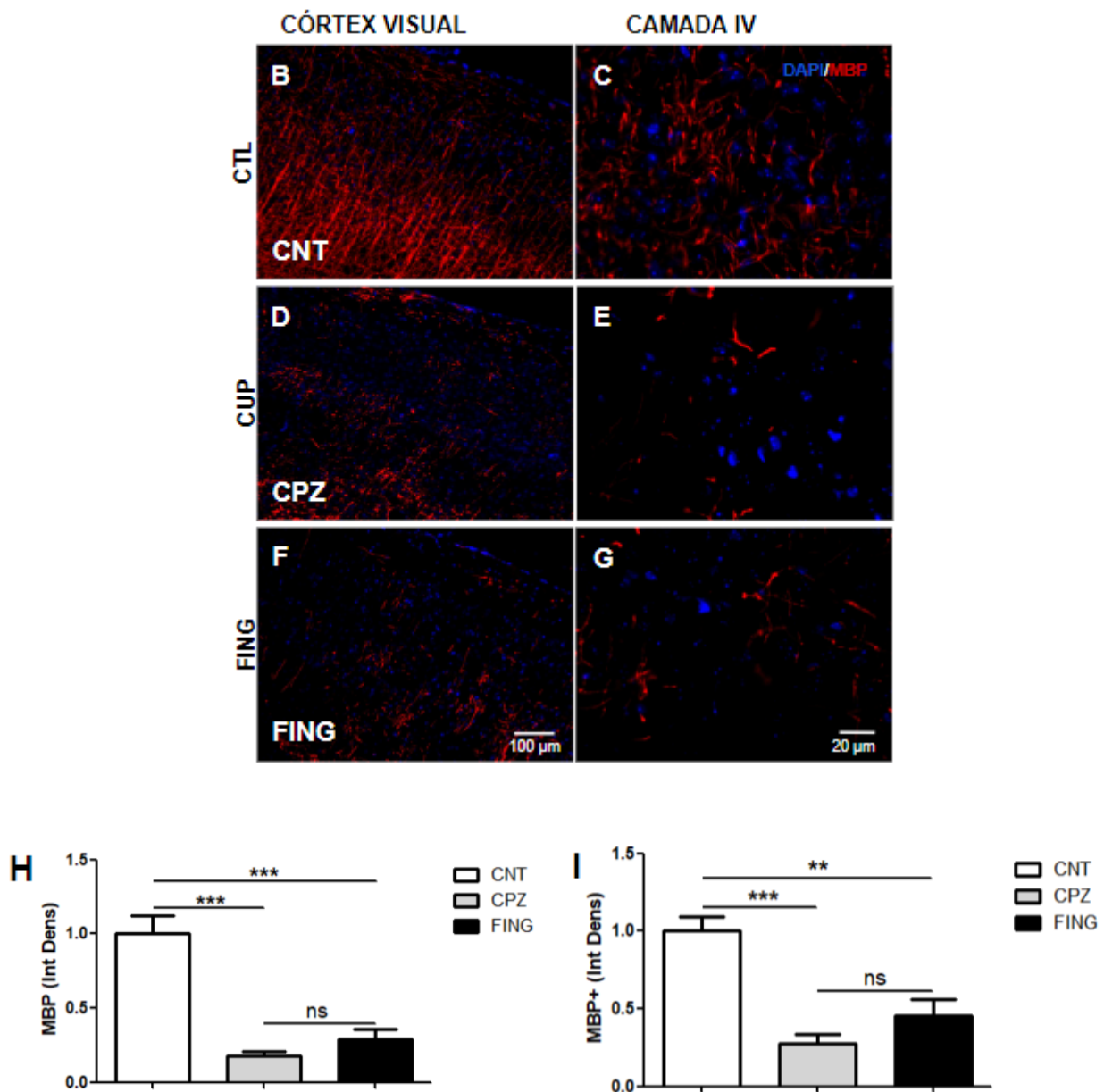


Figura 7: Imunofluorescência para MBP no córtex visual de camundongos. a esquematização da localização do córtex visual no encéfalo de camundongos com ênfase nas camadas corticais, tendo destaque a camada IV, que é nossa região de interesse. b, d, f imagens de imunofluorescência para MBP (vermelho) e DAPI (azul) nos três grupos experimentais (CNT- CPZ - FING) no aumento de 10x mostrando toda região do córtex visual. c, e, g imagens de imunofluorescência para MBP e DAPI no aumento de 40x, evidenciando somente a camada IV do córtex visual. h gráfico da quantificação da densidade integrada da marcação de MBP no aumento de 10x nos três grupo experimentais (CNT n= 5; CPZ n= 5; FING n= 4). i gráfico da quantificação da densidade integrada da imunomarcacão de MBP no aumento de 40x na camada IV do córtex visual (CNT n= 5; CPZ n= 5; FING n=4). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

4.2 Sítios sinápticos totais são reduzidos no modelo de EM e Fingolimode

restaura e/ou previne a sua eliminação

A perda sináptica excitatória já foi caracterizada como um dos principais prejuízos da EM (MANDOLESI et al., 2015). Sendo assim, realizamos imunomarcações para sinaptofisina (SYN), uma proteína pré-sináptica estrutural, a fim de avaliar a expressão de sinapses totais, excitatórias e inibitórias. Análises da camada IV do córtex visual mostraram uma diminuição significativa dos punctas positivos da imunomarcação positiva para SYN no grupo CPZ em relação ao CNT (Figura 8-a,b,d). Interessantemente, o grupo FING apresentou níveis de SYN similares ao CNT (Figura 8-c,d), indicando a capacidade de restaurar e/ou prevenir a perda sináptica encontrada no modelo de EM.

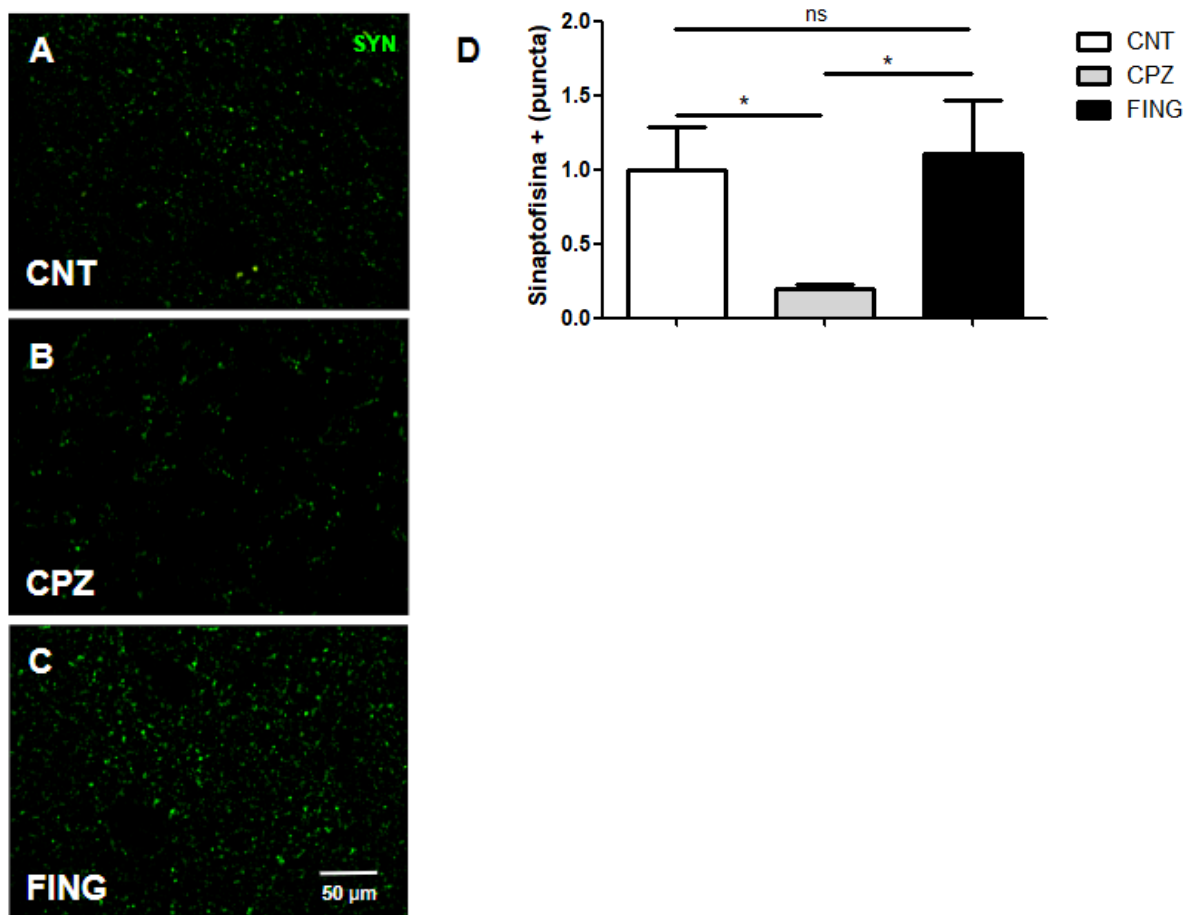


Figura 8: Imunofluorescência para o marcador sináptico sinaptofisina. a, b, c imagens de imunofluorescência para o marcador sináptico geral sinaptofisina (verde) na camada IV do córtex visual no aumento de 100x (CNT n= 3; CPZ n= 5; FING n= 4). **d** gráfico da quantificação dos punctas positivos para sinaptofisina nos três grupos experimentais. * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

4.3 Sítios pós-sinápticos inibitórios são aumentados no modelo de CPZ e FING restaura/ previne o aumento.

Para estudar mais profundamente as alterações sinápticas intrínsecas da EM, avaliamos a densidade de sinapses inibitórias. Utilizamos um marcador estrutural pós-sináptico inibitório, Gefirina. A densidade integrada da marcação positiva para Gefirina aumentou no CPZ em relação ao CNT e, restabeleceu seus valores aos níveis do CNT no grupo FING (Figura 9-a,b,c,d).

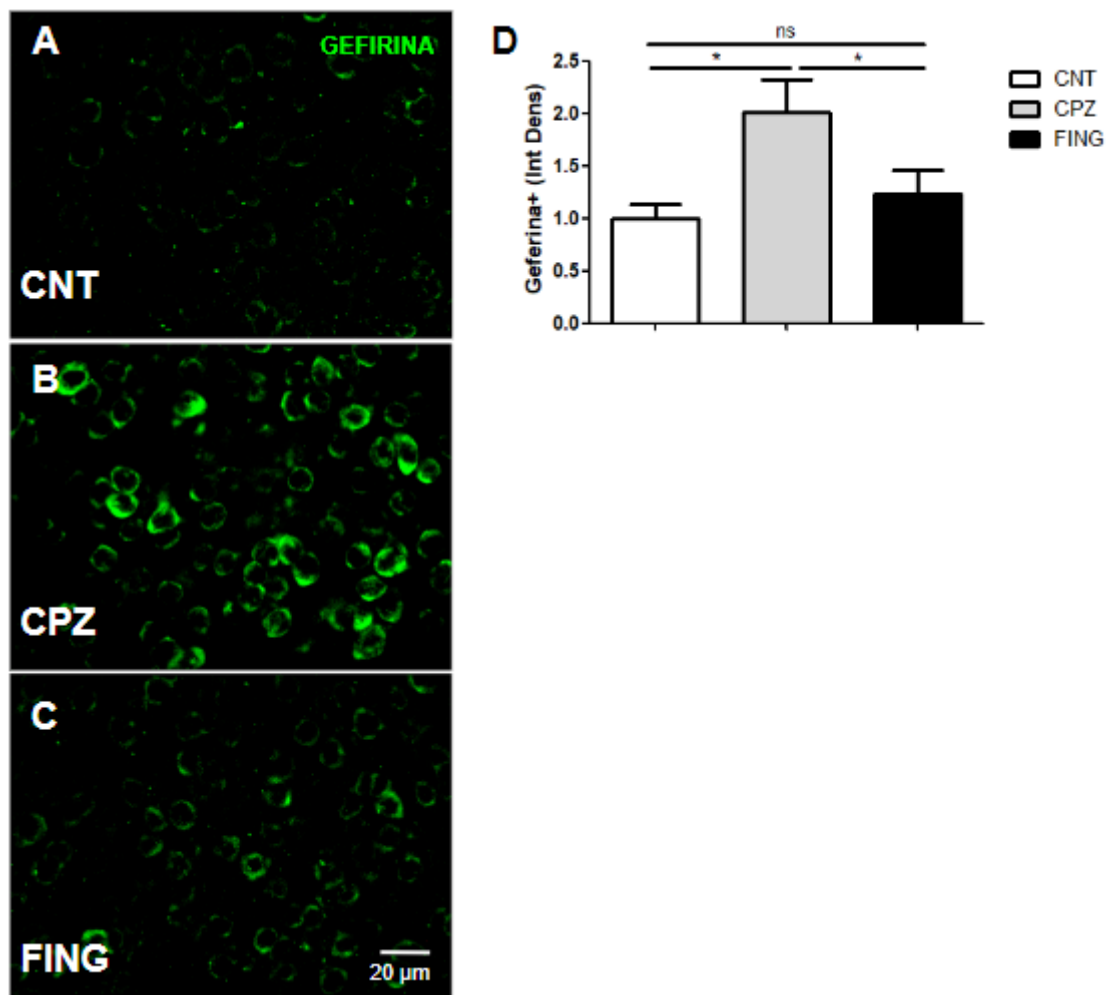


Figura 9: Imunofluorescência o terminal pós-sináptico inibitório Gefirina. a, b, c imagens de imunofluorescência para o marcador estrutural pós-sináptico gefirina no aumento de 40x. **d** gráfico da quantificação da densidade integrada de gefirina (CNT n= 4; CPZ n=3; FING n=4). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

4.4 Terminais sinápticos excitatórios corticais são aumentados no modelo de EM

Para acessar as sinapses excitatórias nós utilizamos um marcador de vesículas de glutamato, vGLUT1, que marca terminações pré-sinápticas corticais. Nossos resultados mostraram um aumento significativo de vGLUT1 no grupo CPZ em relação ao CNT e, uma tendência de reversão desses valores para os níveis do controle após o tratamento com FING.

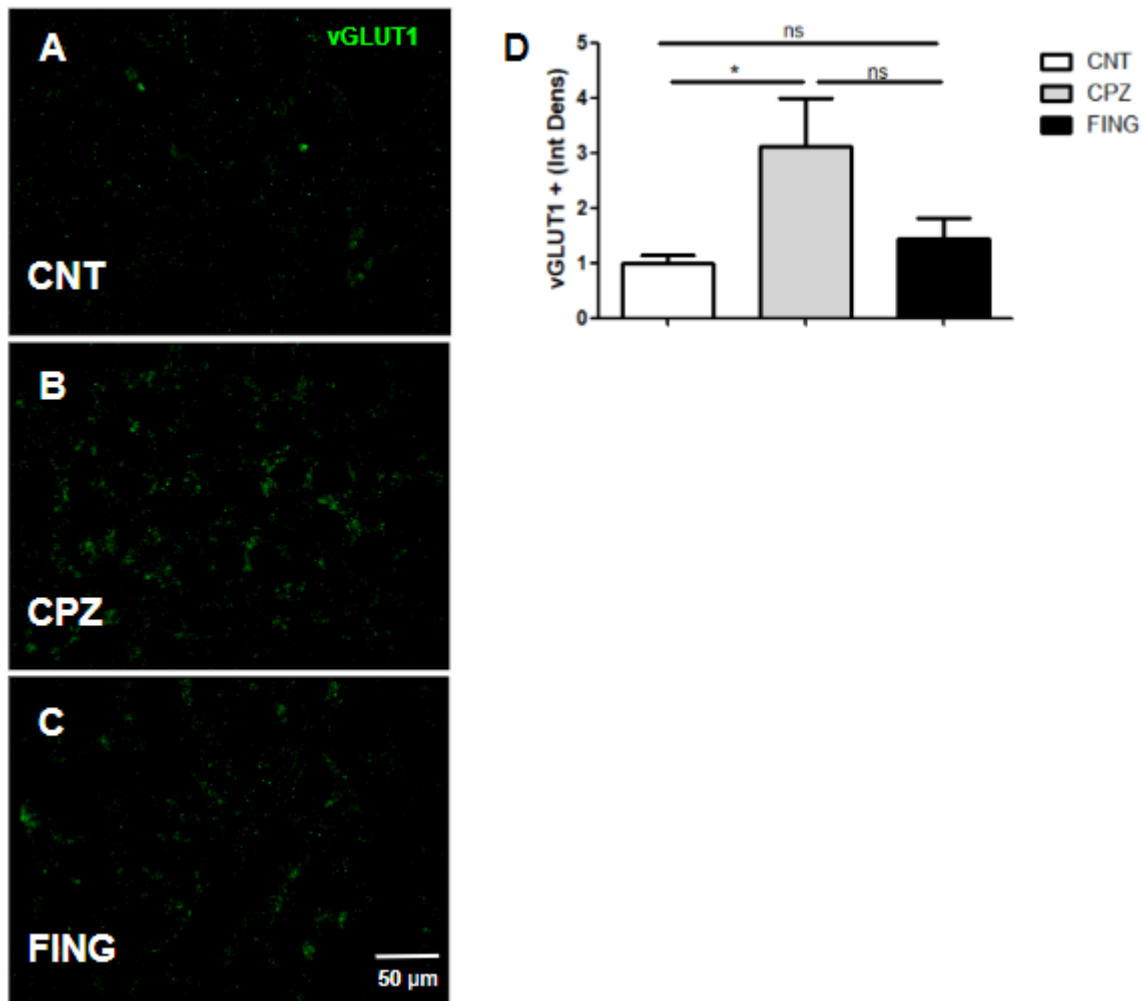


Figura 10: Imunofluorescência para o marcador pré-sináptico excitatório v-GLUT1. a,b,c imagens de imunofluorescência de células v-GLUT1 positivas no aumento de 100x. **d** Quantificação da densidade integrada da marcação positiva para v-GLUT1 (CNT n= 3; CPZ n=2; FING n=3). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

4.5 O nível de ativação dos interneurônios inibitórios não é alterado no modelo de EM e após tratamento com FING

Como já tínhamos observado um aumento de sinapses excitatorias corticais, nos perguntamos se o alvo desses aferentes seriam neurônios inibitórios. Dessa forma,

utilizamos o marcador de ácido glutamato descarboxilase 67 (GAD67), que marca uma enzima envolvida na síntese de GABA, ou seja, interneurônios inibitórios e analisamos a co-localização desse marcador com vGLUT1. Não observamos diferenças significativas na co-marcação de GAD67 e vGLUT1 entre os grupos, apesar de o grupo CPZ mostrar uma tendência de aumento em relação ao CNT (Figura 11).

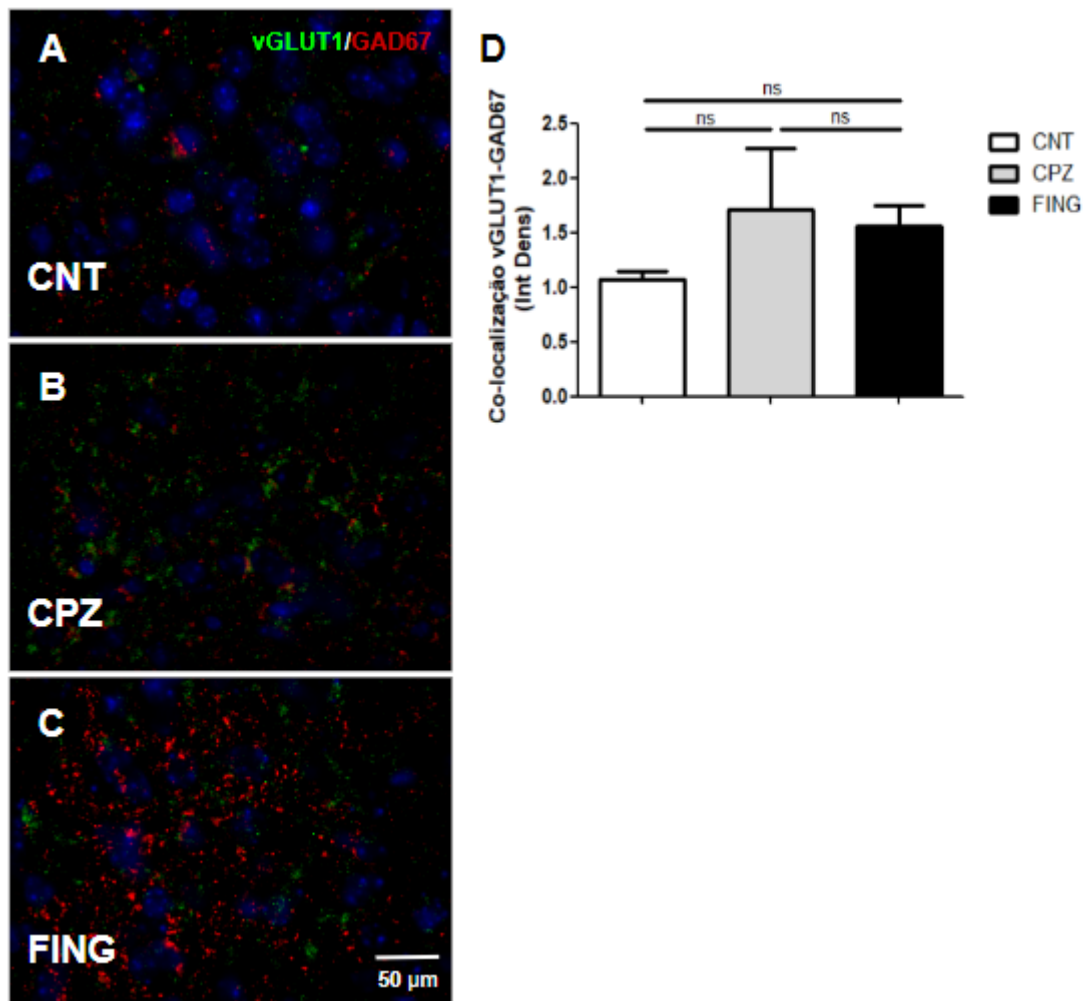
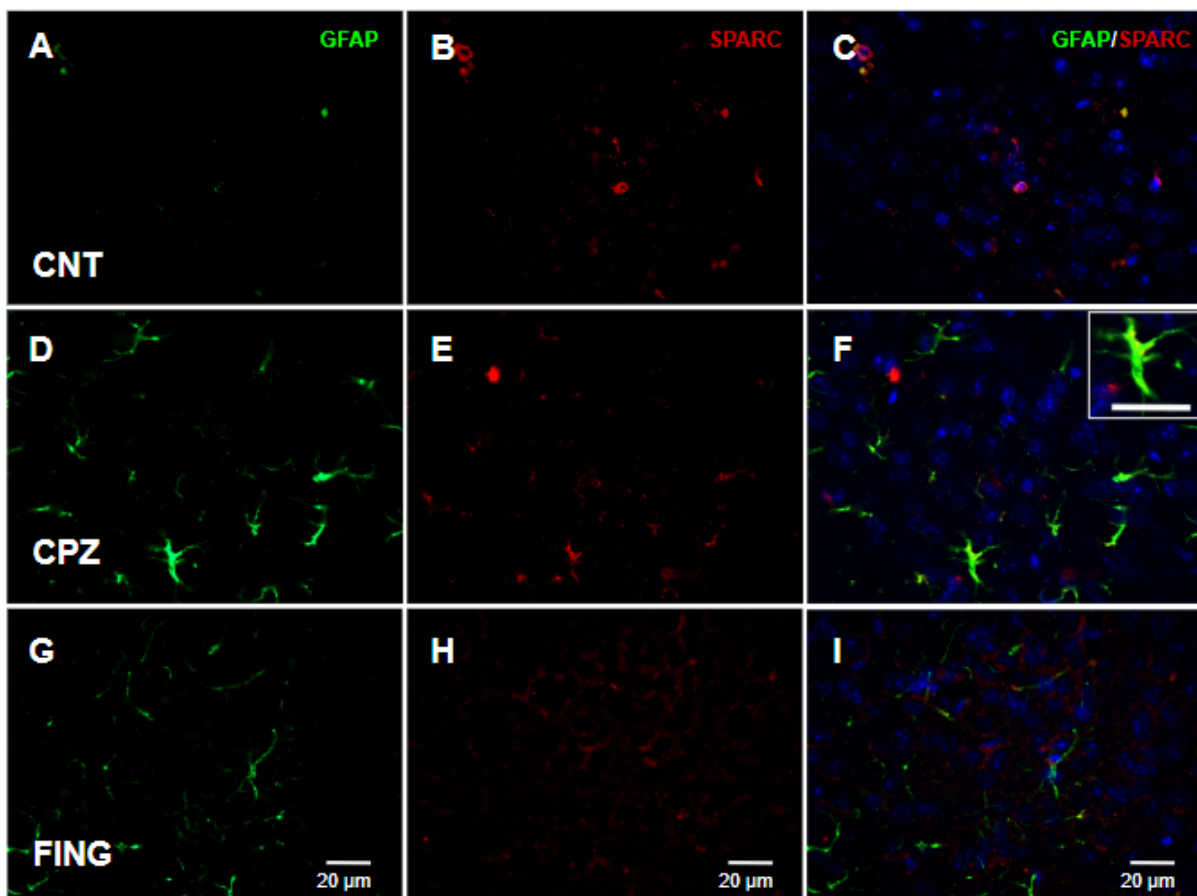


Figura 11: Imunofluorescência da co-marcação de v-GLUT1 e GAD67. a,b,c Imagens de imunofluorescência para co-marcação dos terminais pré-sinápticos excitatórios positivos para v-GLUT1 e para interneurônios inibitórios positivos para GAD67. d Quantificação da densidade de marcação da co-localização de punctas positivos para v-GLUT1/GAD67 (CNT n= 3; CPZ n=2; FING n=3). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

4.6 Em modelo de EM os astrócitos parecem exibir um perfil mais anti-sinaptogênico

Um dos mecanismos que podem afetar a densidade sináptica é a secreção de fatores pró e anti-sinaptogênicos astrocitários (RISHER; RISHER, 2020). Dessa

forma, avaliamos a expressão dos fatores hevína (pró-sinaptogênico) e SPARC (anti-sinaptogênico) total e em astrócitos, imunomarcados para GFAP, nos diferentes grupos. Ambos os grupos, CPZ e FING, evidenciaram um aumento significativo de células marcadas positivamente por GFAP em relação ao CNT, não revertido pelo FING. Contudo, ao avaliar a imunomarcagem positiva para SPARC não foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos (Figura 12-b,e,h,k). Interessantemente, quando avaliamos a co-localização entre GFAP e SPARC, ou seja, a sobreposição dessas duas marcações, percebemos que há um aumento dessa co-marcação no grupo CPZ em relação ao CNT, sugerindo que os astrócitos no grupo que mimetiza EM estariam apresentando um perfil mais anti-sinaptogênico (Figura 12-c,f,i,o). O tratamento com fingolimode manteve os níveis de co-localização do CNT. Nossos resultados mostraram uma tendência de diminuição da quantidade de punctas positivos para hevína no grupo CPZ em relação ao CNT. Há também, uma tendência de recuperação desses valores no FING (Figura 12- l,m,n,p).



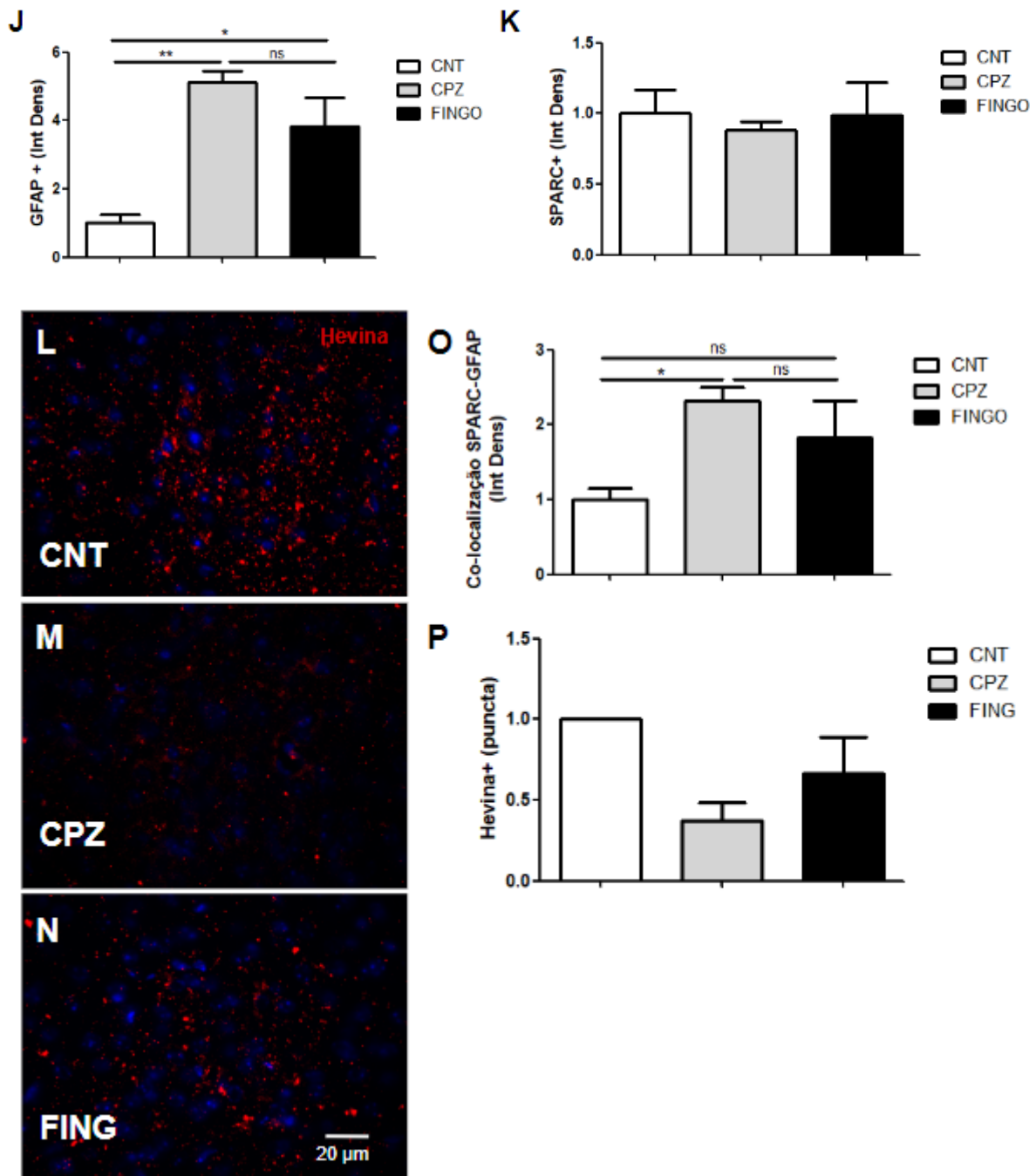


Figura 12: Imunofluorescência para fatores pró e anti-sinaptogênicos astrocitários, Hevina e SPARC, respectivamente. a,d,g imagens de imuno fluorescência para o marcador astrocitário GFAP. **J** quantificação da densidade de marcação de GFAP no aumento de 40x (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **b,e,h** imagens de imunofluorescência para o fator anti-sinaptogênico SPARC. **k** quantificação da densidade de marcação para SPARC (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **c,f,i** imagens de imunofluorescência da co-localização de células GFAP/SPARC positivas. **o** gráfico da quantificação da co-localização GFAP/SPARC positivas (CNT n= 3; CPZ n=3; FING n=3). **l,m,n** imagens de imunofluorescência para o fator pró-sinaptogênico hevina. **p** quantificação dos punctas marcados para hevina no aumento de 40x (CNT n= 1; CPZ n=3; FING n=2). * $p < 0,05$; ns = não significativo; one-way ANOVA.

5. DISCUSSÃO

A utilização de modelos experimentais que mimetizam doenças é de suma importância para que possamos compreender melhor o cenário patológico em questão. Com esse intuito, nós realizamos a imunomarcagem para MBP, para confirmar a confiabilidade do modelo escolhido. Dessa forma, após 5 semanas de tratamento com a droga cuprizona, na concentração de 0,2% observamos uma significativa desmielinização no córtex visual dos camundongos. Esses achados corroboram com tantos outros já descritos anteriormente (ESPÍRITO-SANTO et al., 2021; VEGA-RIQUER et al., 2019) e validam o funcionamento do modelo. Todavia, nós também demonstramos que, mesmo após o tratamento com o Fingolimode os níveis de MBP não são recuperados no córtex visual. Esses achados corroboram dados já publicados sobre o corpo caloso, que mostram a incapacidade do fármaco de proteger contra a desmielinização e/ou de promover a mielinização (NYSTAND et al., 2020).

Dentro desse cenário de EM, alterações sinápticas já foram identificadas como uma marca fisiopatológica da doença, podendo ocorrer mesmo antes dos eventos desmielinizantes (DI FILIPPO et al., 2018; MANDOLESI et al., 2015). Contudo, os detalhes dessas alterações são ainda pouco conhecidos no córtex visual, região responsável pelo processamento de informações visuais que é afetada na EM, culminando em neurite óptica (ARAÚJO et al., 2017). Nossas imunomarcagens para sítio pré-sináptico, SYN, indicaram uma diminuição de sinapses totais no CPZ, corroborando com achados anteriores de nosso grupo em regiões subcorticais visuais (ARAÚJO et al., 2017). Além do mais, vários modelos de estudo de EM e amostras de pacientes já evidenciaram a perda sináptica excitatória e inibitória, em diferentes áreas do SNC, especialmente na fase aguda da doença (HUISKAMP et al., 2022; MOCK, E. et al., 2021; BONFIGLIO et al., 2017). A expressão de SYN também já foi encontrada diminuída na substância cinza da medula espinal de camundongos no pico da doença, que é caracterizada por intensos déficits sensoriais, cognitivos e motores (BLAKELY, et al., 2015). Interessantemente, nossos resultados mostraram que o tratamento com Fingolimode parece restaurar e/ou inibir a perda sináptica tão recorrente na EM, restabelecendo os níveis de SYN. Sabe-se que a ativação da via de S1P está diretamente relacionada com a retração neurítica (QUARTA et al., 2017) e com a

promoção da realocação de proteínas sinápticas para regiões extra-sinápticas (RIGANTI et al., 2016), sendo assim, talvez o Fingolimode possa estar através da internalização e posterior degradação dos receptores dessa via, impedindo sua ativação e inibindo os danos sinápticos causados por ela.

Já que a desmielinização inflamatória no presente modelo de EM culminou em alterações sinápticas gerais, nós resolvemos avaliar mais afincamente essas mudanças. Nesse contexto, utilizamos o marcador sináptico inibitório Gefirina. Nossos achados demonstraram um aumento de sítios pós-sinápticos inibitórios, identificados por Gefirina, no CPZ e um restabelecimento desses valores no FING. Araújo e colaboradores (2017) também demonstraram no mesmo modelo um aumento de sinapses inibitórias no NGL, indicando que a via genículo-cortical deve ter sua atividade mais suprimida em cenário de EM. De fato, estudos já demonstraram os prejuízos causados pela EM, na estrutura e no funcionamento da via visual dos pacientes (BACKNER et al., 2022). Em consonância com nossos achados, Bonfiglio e colaboradores (2017) mostraram a capacidade do FING de restaurar aos níveis normais a excitação do neurotransmissor inibitório GABA, na medula espinal, sugerindo a capacidade do FING de modular a sinalização das sinapses inibitórias.

Para acessar as sinapses excitatórias utilizamos o marcador de vesículas de glutamato, vGLUT1. Os resultados evidenciaram um aumento dessa marcação no CPZ, o que corrobora com dados anteriores onde também descreveram um aumento dessa marcação em camundongos com EAE (POTTER et al., 2016). Sabendo disso, pode parecer incoerente tais resultados, por mostrarmos uma diminuição de sinapses totais no CPZ ao mesmo tempo que evidenciamos um aumento de marcadores de sinapses excitatórias e inibitórias nesse mesmo grupo. Todavia, vale ressaltar, ainda que o vGLUT1 está presente em terminais pré-sinápticos glutamatérgicos de origem cortical (ARAÚJO et al., 2017). Entretanto, na camada IV do córtex visual, recebe em sua maioria, conexões talamocorticais. Araújo e colaboradores (2017) demonstraram que as sinapses excitatórias retinianas no NGL (núcleo geniculado lateral) de animais CPZ estão reduzidas. É provável que a baixa estimulação dos neurônios talâmicos no NGL resulte em densidade mais baixa de terminações geniculocorticais. Embora isso não tenha sido investigado no presente estudo, isso explicaria um nível reduzido de SYN, mesmo na presença de níveis aumentados de vGluT1 e Gefirina na camada

IV do cortex visual. Mais estudos também são necessários para elucidar se os alvos dos aferentes positivos para vGLUT1 são neurônios excitatórios ou inibitórios. Outra hipótese que poderia explicar nosso resultado seria que, o contexto de desmielinização inflamatória poderia estar levando a uma perda dessas sinapses talamocorticais e, perante a essa perda, as sinapses corticais poderiam estar se tornando mais plásticas e ocupando os espaços vazios como forma de compensação. Um fator que poderia estar corroborando para esse cenário de aumento das marcações sinápticas (excitatórias e inibitórias) é o aumento da expressão do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) nos grupos CPZ e FING (Cruz et al., 2023 - dados ainda não publicados). De acordo com artigos anteriores o BDNF está diretamente envolvido com a reabertura de processos plásticos no SNC de camundongos adultos (UENO et al., 2022; DEOGRACIAS et al., 2012). Além disso, apesar da tendência do FING de restaurar os valores de vGLUT1 para os níveis do CNT a diferença não foi significativa. Ainda nesse contexto, já foi descrita a eficácia do fingolimode de restaurar os prejuízos funcionais nas transmissões glutamatérgicas no córtex e hipocampo (BONFIGLIO et al., 2017).

Como observamos alterações nas sinapses excitatórias no CPZ, nos perguntamos se a variação de v-GLUT1 seria sobre as sinapses inibitórias, ou seja, se os neurônios inibitórios estariam recebendo mais aferentes excitatórios e dessa forma, sendo mais estimulados. Sendo assim, realizamos marcações para interneurônios inibitórios (GAD67) e avaliamos sua co-localização com vGLUT1 e, apesar do grupo CPZ mostrar uma tendência de aumento da sobreposição das duas imunomarcações esses valores não foram significativos.

Considerando a diminuição de SYN evidenciada pelo nosso modelo, nos perguntamos se os astrócitos não estariam envolvidos nesse mecanismo de desregulação sináptica, tendo em vista que são células envolvidas tanto em processos relacionados à doença de EM, quanto na promoção de sinaptogênese (RISHER; RISHER, 2020; PONATH et al., 2018). Dessa forma realizamos imunomarcações para SPARC que é um fator anti-sinaptogênico astrocitário e observamos que sua expressão total não muda entre os três grupos. Em contrapartida, quando avaliamos sua co-localização com GFAP, observamos uma maior co-marcação de ambos no grupo CPZ, sugerindo que neste grupo o astrócito possa estar apresentando um perfil mais anti-sinaptogênico. Conseqüentemente,

esse cenário pode estar culminando na perda sináptica evidenciada pelas células SYN positivas, afetando principalmente as sinapses geniculocorticais. Todavia, são necessários mais experimentos como análises de terminais sinápticos talamocorticais para que possamos compreender melhor esse cenário. E como esperado, a densidade integrada da marcação de GFAP é aumentada nos grupos CPZ e FING, pelo fato do GFAP marcar astrócitos reativos, corroborando com dados vistos anteriormente (ESPÍRITO-SANTO et al., 2021; ARAÚJO et al., 2017).

E, por fim, avaliamos de forma preliminar a expressão do fator pró-sinaptogênico Hevina, que está envolvido diretamente com a formação de sinapses excitatórias talamocorticais. Nossos resultados parciais evidenciam que a hevina mostra uma tendência a diminuir seus níveis no CPZ e a recuperar seus valores no FING, sugerindo novamente um perfil pouco sinaptogênico astrocitário no CPZ. Essa tendência de diminuição de hevina no CPZ pode estar relacionada com a perda de SYN no grupo CPZ. Além disso, a restauração da expressão desse fator no FING, além de poder estar relacionada com a SYN no FING, também pode estar relacionada com a promoção e/ou restauração de sinapses talamocorticais, tendo em vista que a ação sinaptogênica de hevina é somente relacionada com formação desse tipo de sinapses, não tendo qualquer ação com as sinapses corticais (SINGH et al., 2016). Todavia, há necessidade da realização de mais experimentos, como a quantificação de marcadores de sinapses talamocorticais e a investigação de outros fatores sinaptogênicos para entendermos melhor o mecanismo envolvido.

6. CONCLUSÃO

A desmielinização inflamatória induzida por CPZ parece ter a capacidade de modular a atividade sinaptogênica astrocitária, reduzindo níveis de fatores pró-sinaptogênicos como a hevína e aumentando a expressão de SPARC, um fator anti-sinaptogênico no córtex visual. Esse contexto mais anti-sinaptogênico parece estar levando a um desbalanço entre excitação/inibição no córtex visual, culminando em uma perda de sinapses genículo corticais em detrimento do aumento de neurônios inibitórios corticais. E o FING parece conseguir reverter e/ou impedir a mudança do perfil sinaptogênico astrocitário, tornando-o mais pró-sinaptogênico, garantindo a promoção e/ou proteção das sinapses do córtex visual. Mais estudos são necessários para se ter certeza do mecanismo envolvido na perda e recuperação/proteção sináptica em modelo de EM, inclusive é necessários acessar marcadores específicos de sinapses talamocorticais para se confirmar nossa hipótese, além de investigar outros fatores sinaptogênicos astrocitários para se entender melhor essa questão.

7- REFERÊNCIAS

- DI FILIPPO, M. et al. Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 19, n. 10, p. 599–609, 2018.
- GARG, N.; SMITH, T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain and Behavior*, v. 5, n. 9, p. 1–13, 2015.
- BONFIGLIO, T. et al. Prophylactic versus therapeutic fingolimod: Restoration of presynaptic defects in mice suffering from experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS ONE*, v. 12, n. 1, p. 1–29, 2017.
- BOSWORTH, A. P.; ALLEN, N. J. The diverse actions of astrocytes during synaptic development. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 47, p. 38–43, 2017.
- WALKER, C. D.; RISHER, W. C.; RISHER, M.-L. Regulation of Synaptic Development by Astrocyte Signaling Factors and Their Emerging Roles in Substance Abuse. *Cells*, v. 9, n. 2, p. 297, 2020.
- PONATH, G.; PARK, C.; PITT, D. The role of astrocytes in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2018.
- LIDDELOW, S. A. et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.
- BRINKMANN, V. et al. Fingolimod (FTY720): Discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 9, n. 11, p. 883–897, 2010.
- ROSSI, S. et al. Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *British Journal of Pharmacology*, v. 165, n. 4, p. 861–869, 2012.
- VEGA-RIQUER, J. M. et al. Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases. *Current Neuropharmacology*, v. 17, n. 2, p. 129–141, 2019.
- FILIPPI, M. et al. Multiple sclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 1–27, 2018.
- LASSMANN, H. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 3, p. 1–15, 2018.
- LASSMANN, H.; BRADL, M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, v. 133, n. 2, p. 223–244, 2017.
- MANDOLESI, G. et al. Synaptopathy connects inflammation and

neurodegeneration in 30 multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, v. 11, n. 12, p. 711–724, 2015.

ALLEN, N. J.; EROGLU, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, v. 96, n. 3, p. 697–708, 2017.

Su, Y., Chen, Z., Du, H., Liu, R., Wang, W., Li, H., & Ning, B. (2019). Silencing miR-21 induces polarization of astrocytes to the A2 phenotype and improves the formation of synapses by targeting glypican 6 via the signal transducer and activator of transcription-3 pathway after acute ischemic spinal cord injury. *FASEB J.* 2019.

QUARTA, S. et al. Sphingosine-1-phosphate and the S1P3 receptor initiate neuronal retraction via RhoA/ROCK associated with CRMP2 phosphorylation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 10, n. October, p. 1–13, 2017.

BASSI, MS. et al. Neurophysiology of synaptic functioning in multiple sclerosis. *Clinical Neurophysiology*, p. 1148-1147, 2017.

SCHUHMANN, MK. et al. Fingolimod (FTY720) Reduces Cortical Infarction and Neurological Deficits During Ischemic Stroke Through Potential Maintenance of Microvascular Patency. *Current Neurovascular Research*, v.13, p. 277-282, 2016.

BLAKELY, P.K. et al. Astrocyte matricellular proteins that control excitatory synaptogenesis are regulated by inflammatory cytokines and correlate with paralysis severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Frontiers in Neuroscience*, v.9, p. 1-11, 2015.

ESPIRITO-SANTO, SES et al. Astrocytes as a target for Nogo-A and implications for synapse formation in-vitro and in a model of acute demyelination. *Glia*, p.1-15, 2021.

BADWIN, K; EROGLU, C. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Neurobiology*, v. 45, p. 113-120, 2017.

ARAÚJO, S. et al. Inflammatory Demyelination Alters Subcortical Visual Circuits. *Journal Of Neuroinflammation*, v. 14, n. 162, 2017.

MICHAILIDOU, I. et al. Complement C1q-C3-associated synaptic changes in multiple sclerosis hippocampus. *Ann. Neurol.* 77, 1007–1026 (2015).

KOOI, E.-J. et al. Cholinergic imbalance in the multiple sclerosis hippocampus. *Acta Neuropathol.* 122, 313–322 (2011).

Möck EEA, Honkonen E and Airas L (2021) Synaptic Loss in Multiple Sclerosis: A Systematic Review of Human Post-mortem Studies. *Front. Neurol.* 12:782599. doi:

10.3389/fneur.2021.782599

DEOGRACIAS R, YAZDANI M, DEKKERS MP, GUY J, IONESCU MC, VOGT KE, et al. Fingolimod, um modulador do receptor de fosfato esfingosina-1, aumenta os níveis de BDNF e melhora os sintomas de um modelo de camundongo da síndrome de Rett. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2012; **109** :14230–14235.

BACKNER,Y. et al., Anatomical and functional visual network patterns in progressive multiple sclerosis, *Hum Brain Mapp*. 2022;43:1590–1597.

HUISKAMP, M. Et al., Inhibitory synaptic loss drives network changes in multiple sclerosis: An ex vivo to in silico translational study, *Multiple Sclerosis Journal*, 2022.

SINGH et al. Astrocytes Assemble Thalamocortical Synapses by Bridging Nrx1 α and NL1 via Hevin, *Cell*. 2016.

KILJAN,S. Et al., Enhanced GABAergic Immunoreactivity in Hippocampal Neurons and Astroglia of Multiple Sclerosis Patients, *J Neuropathol Exp Neurol* Vol. 78, No. 6, June 2019.