

MARCADORES DE ASTRÓCITOS NEUROTÓXICOS E NEUROPROTETORES  
MODULADOS POR FINGOLIMODE EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO  
INFLAMATÓRIA POR CUPRIZONA

**SAULO AUGUSTO ALVES DA CRUZ**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil

Fevereiro/2023

MARCADORES DE ASTRÓCITOS NEUROTÓXICOS E NEUROPROTETORES  
MODULADOS POR FINGOLIMODE EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO  
INFLAMATÓRIA POR CUPRIZONA

**SAULO AUGUSTO ALVES DA CRUZ**

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: Dra. Sheila Espírito Santo Araújo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO - UENF  
Campos dos Goytacazes - RJ - Brasil  
Fevereiro/2023

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

C957

Cruz, Saulo Augusto Alves da.

MARCADORES DE ASTRÓCITOS NEUROTÓXICOS E NEUROPROTETORES MODULADOS POR FINGOLIMODE EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO INFLAMATÓRIA POR CUPRIZONA. / Saulo Augusto Alves da Cruz. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2023.

49 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.

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

CDD - 570

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

**Saulo Augusto Alves da Cruz**

MARCADORES DE ASTRÓCITOS NEUROTÓXICOS E NEUROPROTETORES  
MODULADOS POR FINGOLIMODE EM MODELO DE DESMIELINIZAÇÃO  
INFLAMATÓRIA POR CUPRIZONA

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

Aprovado em 28 de fevereiro de 2023

Banca examinadora:



---

Prof. Rafael Brito da Silva (Dr. em Neuroimunologia) - UFF



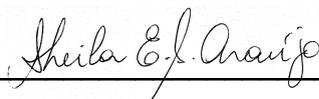
---

Profa. Anna Lvovna Okorokova Façanha (Dra. em Genética) - UENF



---

Prof. Sérgio Henrique Seabra (Dr. em Biofísica) - UENF



---

Profa. Sheila Espírito Santo Araújo (Dra. em Biofísica) - UENF

*Que o amanhã seja melhor do que o agora.  
E que o agora seja bem mais do que trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço à minha esposa, Ana Carolina, que, com todo o seu afeto e força me deu suporte nas batalhas do dia a dia. Se doou integralmente por nossa família e pelo nosso trabalho, que agora chega em uma nova etapa. Me acolheu nos momentos de desespero, comemorou comigo os momentos de vitória e me suportou nos momentos de fraqueza. Sou muito grato à esta mulher que é muito mais que minha esposa. É minha cúmplice.*

*Agradeço também à outra mulher importantíssima para minha vida. Àquela que me trouxe ao mundo e que, mesmo à distância, me dá tanto suporte. Àquela que me inspirou e me inspira em minha carreira acadêmica. Que inspira meu sonho de lecionar. À minha mãe, Nadir, que além de mãe, é minha maior Professora.*

*Agradeço à minha filha Laura, por trazer leveza à minha vida, mesmo nos momentos difíceis. Por me dar forças para travar as batalhas da rotina. Por me dar carinho e por me divertir com as suas palhaçadas. E por me inspirar a sempre buscar a minha melhor versão.*

*Agradeço à minha Professora orientadora, Sheila, por permitir que eu tenha esta experiência e por participar, de maneira tão assídua, da minha formação. Agradeço pelas horas doadas e pela importância que ela dá ao meu progresso.*

*Agradeço aos Professores Renato e Serginho por me receberem tão bem no LBCT e por contribuírem tanto para o meu trabalho. Também agradeço à UENF e às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ por proporcionarem o desenvolvimento da nossa pesquisa.*

*Agradeço fortemente aos amigos que fiz no laboratório. Listando os nomes e correndo o risco de esquecer de alguém: Phill, Pedro, Tâmara, Milena, Bia, Daniel, Marcos, Lícia, Fred, Duda, enfim... Toda a galera do LBCT que fez, dos momentos de trabalho, momentos mais leves.*

*Por fim, agradeço aos meus irmãos do Motoqueiros X que, mesmo distantes, torcem pelo meu sucesso e me inspiram a dar o meu melhor sempre.*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	7
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1 Esclerose Múltipla.....	11
1.2 Fisiopatologia.....	13
1.3 Astrócitos na EM.....	15
1.4 Fingolimode.....	18
1.5 Modelo de desmielinização por Cuprizona.....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1 Objetivo Geral.....	23
2.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Animais.....	23
3.2 Tratamentos.....	24
3.3 Preparo Histológico.....	24
3.4 Imunofluorescência.....	25
3.5 Processamento e Quantificação das Imagens.....	27
3.6 Análises Estatísticas .....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	28
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	45

## LISTA DE ABREVIACOES

**Arg1:** *Arginase 1*

**BDNF:** *Brain-derived neurotrophic factor*

**BHE:** Barreira Hemato Encefálica

**BSA:** *Bovine Serum Albumine*

**CTL:** Grupo controle

**CUP:** Grupo cuprizona

**DMSO:** *Dimethyl sulfoxide*

**EAE:** Encefalomielite autoimune experimental

**EM:** Esclerose Múltipla

**EMPP:** Esclerose Múltipla Primária Progressiva

**EMPS:** Esclerose Múltipla Progressiva Secundária

**EMRR:** Múltipla Remitente-Recorrente

**FING:** Grupo fingolimode

**GFAP:** *Glial fibrillary acidic protein*

**IFN- $\gamma$ :** *Interferon gamma*

**IL-1 $\alpha$ :** *Interleukin 1-alpha*

**IL-1 $\beta$ :** *Interleukin 1-beta*

**IL-4:** *Interleukin 4*

**IL-6:** *Interleukin 6*

**IL-10:** *Interleukin 10*

**IL-13:** *Interleukin 13*

**IL-17:** *Interleukin 17*

**iNOS:** *Inducible nitric oxide synthase*

**LAMP1:** *Lysosome-associated membrane protein 1*

**MBP:** *Myelin basic protein*

**NGS:** *Normal Goat Serum*

**NO:** *Nitric Oxide*

**PBS:** *Phosphate Buffer Saline*

**PFA:** *Paraformaldehyde*

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**S1P:** *sphingosine 1-phosphate*

**S1PR:** *sphingosine 1-phosphate receptor*

**TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor alpha*

**TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta*

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1 - Tipos de fármacos utilizados no tratamento de EM.**

**Tabela 2 - Anticorpos primários**

**Tabela 3 - Anticorpos secundários**

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1 - Imagem representativa da fisiopatologia da Esclerose Múltipla.**

**Figura 2 - Astrócitos neurotóxicos e neuroprotetores induzidos por fatores inflamatórios.**

**Figura 3 - Mecanismo de ação do Fingolimode sobre linfócitos T.**

**Figura 4 - Desmielinização inflamatória induzida por Cuprizona.**

**Figura 5 - Tratamento dos animais.**

**Figura 6 - Região analisada nas imunofluorescências.**

**Figura 7 - Imunofluorescência para MBP no córtex visual dos camundongos.**

**Figura 8 - Imunofluorescência para GFAP e LAMP1 na camada IV do córtex visual dos camundongos.**

**Figura 9 - Imunofluorescência para C3 e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.**

**Figura 10 - Imunofluorescência para Arg1 e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.**

**Figura 11 - Imunofluorescência para BDNF e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.**

## RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune desmielinizante do Sistema Nervoso Central (SNC), e atinge milhões de pessoas pelo mundo, causando sintomas motores, cognitivos e sensoriais, sendo, a visão, particularmente afetada. A participação de células imune periféricas na fisiopatologia da doença é algo bem descrito, e as terapias farmacológicas utilizadas na clínica têm estas células como alvo. Contudo, as células imune residentes do SNC, como os astrócitos, também contribuem ativamente para mecanismos benéficos e deletérios da doença e poderiam ser alvos farmacológicos estratégicos para o tratamento da EM. Astrócitos podem adotar diferentes perfis de reatividade quando desafiados com estímulos inflamatórios. Na EM, pode-se encontrar astrócitos neurotóxicos, que agravam a doença, e astrócitos neuroprotetores, que atenuam a doença, com prevalência dos neurotóxicos. O Fingolimode é um dos principais fármacos para o tratamento da EM, alvejando linfócitos e inibindo sua migração para o SNC. Além disso, já foi demonstrado que o fármaco também pode alvejar células do SNC, como astrócitos, apesar de não se saber seus efeitos sobre estas células. Com isso, nosso trabalho buscou avaliar os efeitos do Fingolimode sobre marcadores astrocitários relacionados a fenótipos neurotóxicos e neuroprotetores em modelo de desmielinização por Cuprizona. O modelo permite investigar mecanismos fisiopatológicos análogos aos da EM, com participação central das células do SNC. A região anatômica investigada por nós foi o córtex visual, que é afetado na EM, porém pouco estudada no modelo de Cuprizona. Demonstramos, por imunofluorescência para MBP, que o Fingolimode não é capaz de reverter a desmielinização induzida por Cuprizona. Também mostramos, por imunomarcção para GFAP, que reatividade astrocitária é observada no modelo de Cuprizona e com o tratamento com Fingolimode. Além de que marcadores inflamatórios de astrócitos, como LAMP1, C3 e Arg1 são aumentados no modelo de Cuprizona e que o Fingolimode não os modula. Por outro lado, imunofluorescência para BDNF e GFAP demonstrou que o fator neurotrófico aumenta com a Cuprizona e que o BDNF astrocitário aumenta ainda mais com o tratamento com Fingolimode. Nossos resultados sugerem que o Fingolimode induz resposta neuroprotetora astrocitária no córtex visual de camundongos desmielinizados com Cuprizona.

## **ABSTRACT**

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease of the Central Nervous System (CNS), and affects millions of people around the world, causing motor, cognitive and sensory symptoms, with vision being particularly affected. The participation of peripheral immune cells in the pathophysiology of the disease is something well described, and the pharmacological therapies used in the clinic have these cells as a target. However, CNS resident immune cells, such as astrocytes, also actively contribute to beneficial and deleterious mechanisms of the disease and could be strategic pharmacological targets for the treatment of MS. Astrocytes can adopt different reactivity profiles when challenged with inflammatory stimuli. In MS, neurotoxic astrocytes can be found, which aggravate the disease, and neuroprotective astrocytes, which attenuate the disease, with a prevalence of neurotoxic agents. Fingolimod is one of the main drugs for the treatment of MS, targeting lymphocytes and inhibiting their migration to the CNS. In addition, it has already been demonstrated that the drug can also target CNS cells, such as astrocytes, although its effects on these cells are not known. Therefore, our work sought to evaluate the effects of Fingolimod on astrocytic markers related to neurotoxic and neuroprotective phenotypes in a model of demyelination by Cuprizone. The model makes it possible to investigate pathophysiological mechanisms similar to those of MS, with central participation of CNS cells. The anatomical region investigated by us was the visual cortex, which is affected in MS, but little studied in the Cuprizone model. We demonstrated, by immunofluorescence for MBP, that Fingolimod is not capable of reversing Cuprizone-induced demyelination. We also show, by immunostaining for GFAP, that astrocytic reactivity is observed in the Cuprizone model and with Fingolimod treatment. Furthermore, astrocyte inflammatory markers such as LAMP1, C3 and Arg1 are increased in the Cuprizone model and that Fingolimod does not modulate them. On the other hand, immunofluorescence for BDNF and GFAP demonstrated that the neurotrophic factor increases with Cuprizone and that astrocytic BDNF increases even more with Fingolimod treatment. Our results suggest that Fingolimod induces astrocytic neuroprotective response in the visual cortex of demyelinated mice with Cuprizone.

## **1 - Introdução**

### **1.1 - Esclerose Múltipla**

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença de caráter autoimune, neuroinflamatória e neurodegenerativa que afeta o Sistema Nervoso Central, causando déficits sensoriais, motores e cognitivos em seus pacientes (Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019). A doença atinge principalmente adultos jovens entre 20 e 40 anos de idade, sendo a principal disfunção neurológica não traumática nesta faixa etária (Giovannoni et al., 2016; Lazo-Gomez et al., 2019). Cerca de 2,3 milhões de pessoas pelo mundo são afetadas pela EM (Ohlmeier et al., 2020), sendo 40 mil pacientes pelo Brasil, de acordo com a Associação Brasileira de Esclerose Múltipla (ABEM, 2022).

As manifestações clínicas da doença são heterogêneas, variando de paciente para paciente, com diferentes graus de severidade e de modalidades sintomáticas (Lazo-Gomez et al., 2019). Entre os sintomas observados na clínica listam-se: fadiga muscular; perda da mobilidade; disfunções urinárias, intestinais e sexuais; dificuldades de fala; déficits cognitivos, como de raciocínio e memória; e perdas momentâneas ou duradouras da visão (Graham e Klistorner, 2016; Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019; Ohlmeier et al., 2020). Os déficits visuais são particularmente comuns entre os pacientes, ocorrendo em cerca de 80% dos casos de EM (Graham e Klistorner, 2016; Cooray et al., 2019).

A forma mais comum de EM observada na clínica é a denominada Esclerose Múltipla Remitente-Recorrente. Os sintomas, nesta forma clínica, se manifestam em surtos de intensa debilitação, seguidos de períodos de atenuação e recuperação dos quadros clínicos. Há também as formas progressivas da doença, embora ocorram mais raramente. A EM progressiva pode ser desenvolvida a partir da evolução de um caso de EM Remitente-Recorrente, denominando-se Esclerose Múltipla Progressiva Secundária; ou pode ocorrer desde a primeira manifestação da doença, denominando-se Esclerose Múltipla Progressiva Primária. A diferença entre a EM Remitente-Recorrente e as formas progressivas, é que, diferente da alternância entre surto e remissão presente na primeira, os quadros progressivos apresentam debilitação contínua em seus pacientes até que o acúmulo de danos se torne letal (Lazo-Gomez et al., 2019; Kunkl et al., 2020). No entanto, não é tão simples a classificação da doença e há muitas variações de paciente para paciente, havendo

divergências clínicas mesmo entre pacientes classificados com a mesma forma de doença (Lazo-Gomez et al., 2019).

Apesar da heterogeneidade da EM, parte do que a define é a autoimunidade contra a mielina encontrada no SNC. Células imune do paciente se encontram reativas contra auto-antígenos de mielina e passam a atacar as células responsáveis pela mielinização no encéfalo e na medula espinal, os oligodendrócitos (Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019; Olcum et al., 2019). A mielina é responsável por envolver os axônios neuronais, como espécie de isolante elétrico, permitindo a condução rápida e eficiente dos impulsos nervosos (Purves et al., 2010). O ataque autoimune contra a mielina prejudica, portanto, a propagação dos impulsos nervosos no SNC, além de gerar várias consequências relacionadas à inflamação e lesão tecidual (Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019; Olcum et al., 2019).

A etiologia da EM é desconhecida, apesar de existirem fatores genéticos e ambientais considerados de risco para o desenvolvimento da doença. Hereditariedade, tabagismo, baixa exposição ao sol e infecções virais são alguns dos fatores que se correlacionam com o aumento da probabilidade de se desenvolver a EM (Parnell e Booth, 2017; Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019). Mas os eventos pelos quais ocorre a ativação autoimune contra a mielina ainda é um mistério. Alguns autores se utilizam de algumas evidências para defender a hipótese de que a autoimunidade se inicia na periferia e que somente depois a inflamação alcança o SNC gerando a desmielinização (Lucas et al., 2011; Robinson et al., 2014; Lazo-Gomez et al., 2019). Outros apresentam dados que sugerem que o processo se inicia no SNC, em um processo primário de degeneração da mielina, ação inflamatória das células imune residentes (microglia e astrócitos), e ativação secundária de células imune periféricas (Yogev et al., 2012; Dendrou et al., 2015; Voet et al., 2018; Lazo-Gomez et al., 2019). E há ainda os que cogitam que as duas hipóteses (periférica e central) podem ocorrer em diferentes casos (Lazo-Gomez et al., 2019). De qualquer forma, a questão da origem da EM permanece em aberto.

Por muito tempo a EM foi caracterizada por placas desmielinizantes focais em regiões de substância branca, onde se encontram muitos tratos axonais mielinizados e relativamente poucos corpos celulares neuronais e poucas conexões sinápticas. No entanto, posteriormente tornou-se claro que as lesões desmielinizantes também ocorrem em regiões de substância cinzenta, como o córtex (Brownell e Hughes, 1962; Lassman, 2018). O afetamento destas regiões ajuda a explicar, inclusive

alguns sintomas, como prejuízos cognitivos e sensoriais (Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019). Os déficits visuais são comuns entre os pacientes se correlacionam com as lesões desmielinizantes encontradas no córtex visual (Graham e Klistorner, 2016; Cooray et al., 2019). Além disso, a literatura recente demonstra que a EM também afeta as sinapses (Mandolesi et al., 2015; Lazo-Gomez et al., 2019; Mock et al., 2021; Huiskamp et al., 2022), encontradas em grandes quantidades nas regiões corticais. O que permite a classificação de sinaptopatia à doença, além da canônica classificação de neuroinflamação desmielinizante (Mock et al., 2021; Huiskamp et al., 2022). Nosso grupo inclusive demonstrou alterações sinápticas no córtex visual em um modelo experimental de EM (Espírito-Santo et al., 2021). Estudos que investigam eventos fisiopatológicos da EM no córtex visual são necessários para a compreensão dos sintomas visuais, além de serem úteis para a compreensão de como a doença afeta regiões de substância cinzenta.

## **1.2 - Fisiopatologia**

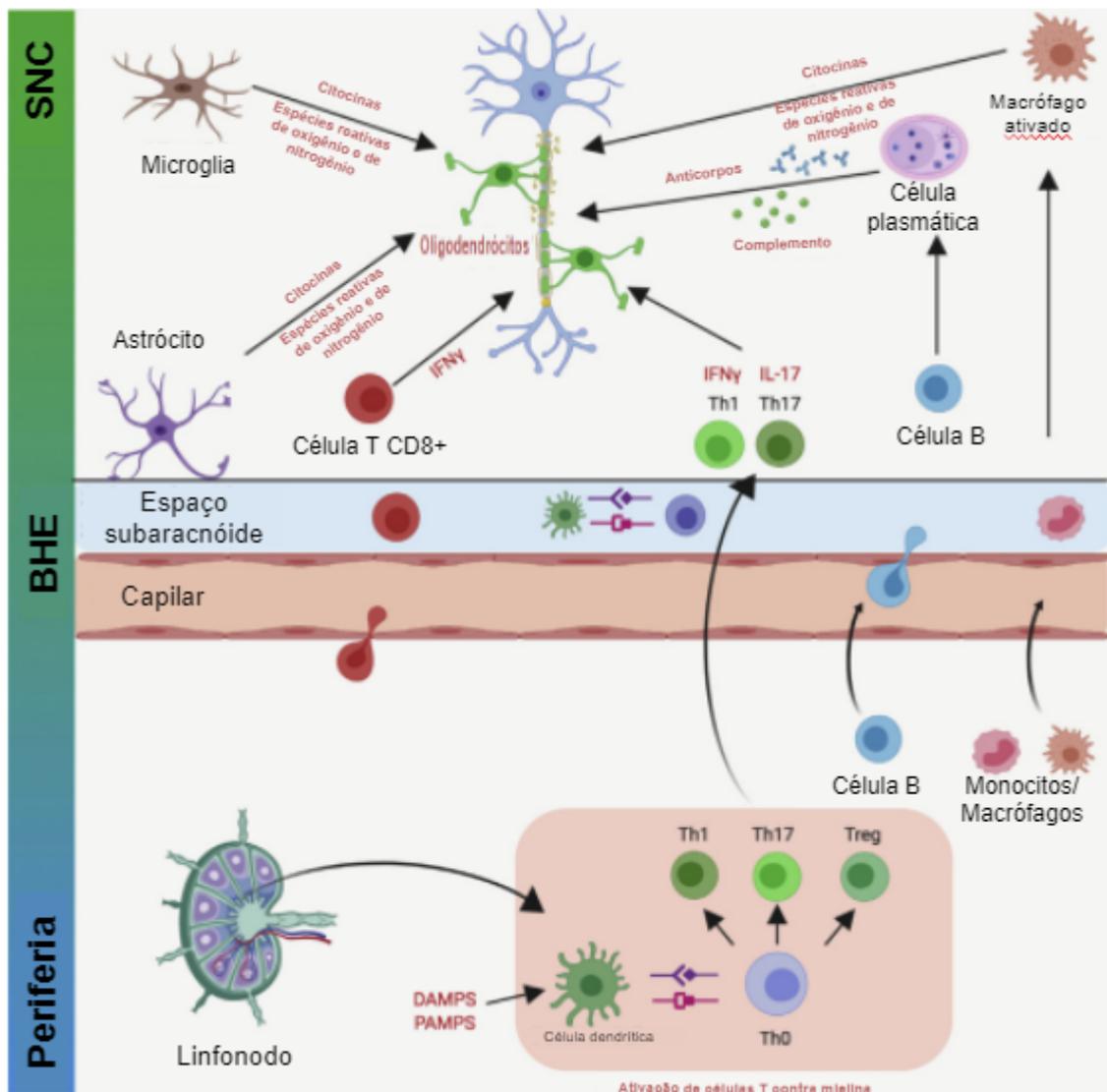
A fisiopatologia da EM se dá em três principais componentes que não ocorrem necessariamente em ordem cronológica. A ativação de células imune periféricas, sobretudo linfócitos T autorreativos, contra auto-antígenos de mielina; a quebra da Barreira Hematoencefálica (BHE), que passa a permitir a infiltração de células periféricas no parênquima do SNC; e a ativação das células imune residentes, microglia e astrócitos (Lassman, 2018, Lazo-Gomez et al., 2019; Olcum et al., 2019; Kunkl et al., 2020).

A participação de células imune periféricas é amplamente descrita na literatura. Os linfócitos T são fundamentais para a ativação de outras células. Secretam citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e IL-17, induzem reatividade tanto de outras células de origem periféricas, quanto as células residentes (Olcum et al., 2019; Kunkl et al., 2020). Linfócitos B reativos se convertem em células plasmáticas secretando anticorpos e proteínas do sistema complemento contra a mielina, induzindo atividade fagocítica por outras células (Olcum et al., 2019). Os linfócitos B também passam a desempenhar função de apresentação antigênica, ativando várias células contra a mielina (Olcum et al., 2019; Kunkl et al., 2020). Monócitos e Macrófagos também são atraídos pela presença de quimiocinas, como CCL2, CCL3, CXCL1, CXCL5, e CX3CL1 (Cui et al., 2020). Tais células atuam na fagocitose de mielina e na secreção de fatores citotóxicos (Olcum et al., 2019; Cui et al., 2020).

Linfócitos T CD8+ também participam ativamente na secreção de citocinas e na citotoxicidade contra oligodendrócitos. Todas estas células também contribuem para a produção e secreção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como o óxido nítrico (NO) que induz morte de oligodendrócitos e de neurônios (Olcum et al., 2019; Kunkl et al., 2020).

O SNC é isolado da periferia pela BHE, que é composta, principalmente, pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos e por astrócitos. Em condições homeostáticas, a BHE protege o SNC contra substâncias tóxicas, patógenos e células periféricas, que podem gerar danos, principalmente em neurônios, que são muito sensíveis (Purves et al., 2010). As células endoteliais se encontram fortemente aderidas entre si por junções ocludentes, impedindo a entrada de células entre elas (Purves et al., 2010; Lazo-Gomez et al., 2019). Em contextos inflamatórios como da EM, estas junções ocludentes são reduzidas e a BHE se torna mais permeável. Esta quebra da BHE agrava a inflamação na doença por permitir a infiltração de mais células imune periféricas (Lassman, 2018; Lazo-Gomez et al., 2019; Olcum et al., 2019).

Microglia e astrócitos se tornam reativas em meio às reações inflamatórias do ambiente e passam a secretar citocinas, quimiocinas, NO, além de desempenharem atividade fagocítica contra a mielina (Ponath et al., 2018; Chu et al., 2018; Voet et al., 2018; Yi et al., 2019; Lazo-Gomez et al., 2019; Olcum et al., 2019; Kwon e Koh, 2020). Tais células que, em condições homeostáticas, protegem neurônios e oligodendrócitos, através de secreção de fatores neurotróficos, deixam de desempenhar funções neuroprotetoras, no contexto inflamatório da EM (Ponath et al., 2018; Chu et al., 2018; Voet et al., 2018; Yi et al., 2019; Kwon e Koh, 2020). Astrócitos, que também são importantes para a integridade da BHE, retraem seus processos se deslocando das células endoteliais, agravando a quebra de barreira (Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019). A **figura 1** ilustra a fisiopatologia da EM mediada por estes componentes.



**Figura 1 - Imagem representativa da fisiopatologia da Esclerose Múltipla.** Imagem ilustra a participação de células imune periféricas e das células imune residentes do SNC, astrócitos e microglia. A parte inferior da imagem mostra a ativação de linfócitos T contra auto-antígenos de mielina, e o egresso dos linfonodos. Juntamente com células B e monócitos/macrófagos, as células periféricas cruzam a BHE, alcançando o SNC e estabelecendo ação inflamatória, secretando citocinas, anticorpos contra a mielina e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Astrócitos e microglia também se tornam reativas agravando a inflamação e atacando os oligodendrócitos. Fonte: Traduzido de Olcum et al., 2019.

### 1.3 - Astrócitos na EM

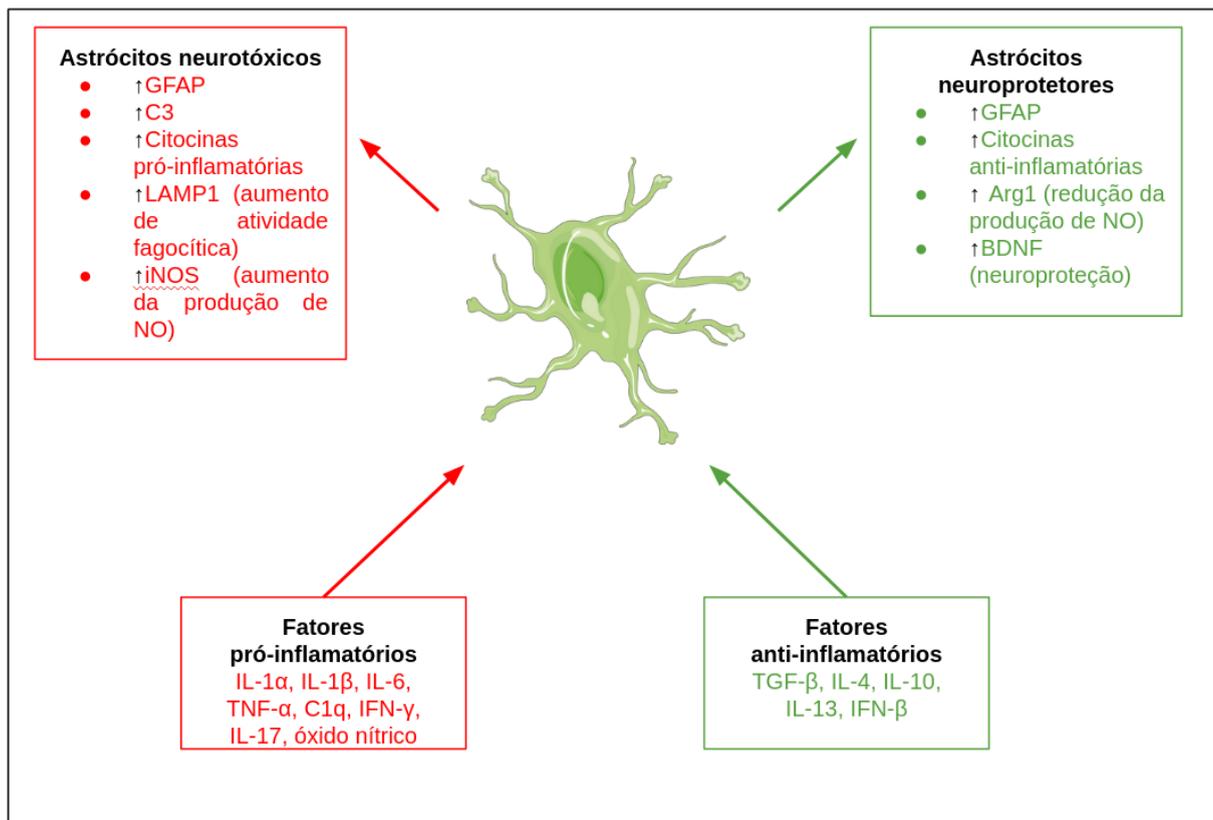
Astrócitos são células que participam de praticamente todo o funcionamento do SNC, seja de maneira direta ou indireta. Fazem parte das funções homeostáticas astrocitárias: mediação entre os vasos sanguíneos e o SNC, fornecendo nutrientes aos neurônios; funções de barreira, compondo a BHE; manutenção da composição iônica extracelular; estruturação de sinapses neuronais; recaptação, reciclagem e liberação de neurotransmissores; liberação de fatores tróficos e de crescimento para neurônios e oligodendrócitos; dentre outras (Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019).

As funções homeostáticas astrocitárias podem sofrer alterações drásticas, a depender dos estímulos inflamatórios recebidos. Citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, dentre outras) tendem a induzir fenótipos neurotóxicos astrocitários que passam a atuar agravando a inflamação e gerando danos teciduais (Liddelow et al., 2017; Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019). Foi demonstrado também que a indução de fenótipo neurotóxico em astrócitos está intimamente relacionada a fatores secretados pela microglia (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e C1q) (Liddelow et al., 2017). Os astrócitos neurotóxicos passam a atuar: aumentando os níveis locais de citocinas e quimiocinas, que ativam e atraem outras células inflamatórias para o local; aumentando a citotoxicidade mediada por NO, produzido pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) (Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019); realizando fagocitose, sobretudo sobre a mielina, indicada pelo aumento de marcadores lisossomais, como a proteína membrana 1 associada à lisossomos (LAMP1) e pela co-localização da proteína, com proteínas de mielina (Ponath et al., 2017); reduzindo atividades neurotróficas, secretando menos fatores de crescimento, como o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), o que reduz a sobrevivência de neurônios e oligodendrócitos (Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019; Araki et al., 2020; Escartin et al., 2021); e recentemente foi descrito o aumento da expressão da proteína do complemento C3 como um dos principais marcadores de astrócitos neurotóxicos (Liddelow et al., 2017).

Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ , dentre outras) são capazes de induzir fenótipo neuroprotetor astrocitário (Liddelow e Barres, 2017; Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019). Astrócitos neuroprotetores atuam: promovendo sobrevivência neuronal e oligodendrócitos, aumentando a secreção de BDNF e outros fatores; secretando mais citocinas anti-inflamatórias, inibindo a ativação de outras células inflamatórias; e diminuindo a produção de NO, por meio da atividade da enzima arginase 1 (Arg1), que antagoniza a função da iNOS por consumir o substrato arginina (Liddelow e Barres, 2017; Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019; Araki et al., 2020; Escartin et al., 2021).

Existem também marcadores de reatividade astrocitária que se encontram aumentados nos dois fenótipos, denominando-se marcadores de pan reatividade (Liddelow et al., 2017; Escartin et al., 2021). O marcador de reatividade astrocitária mais descrito é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP). A proteína de citoesqueleto astrocitário é expressa em níveis diferentes dependendo da região analisada (Zhang

et al., 2019). No entanto, contextos pró- ou anti-inflamatórios tendem a aumentar drasticamente os níveis de GFAP expressos nos astrócitos (Liddelow et al., 2017; Escartin et al., 2021). O aumento de GFAP nestes contextos se correlaciona com modulação na morfologia astrocitária induzindo hipertrofia (Liddelow et al., 2017). A **figura 2** esquematiza os diferentes fenótipos astrocitários.



**Figura 2 - Astrócitos neurotóxicos e neuroprotetores induzidos por fatores pró ou anti-inflamatórios.** Imagem esquematiza como fatores pró-inflamatórios induzem fenótipo neurotóxico astrocitário; e como fatores anti-inflamatórios induzem fenótipo neuroprotetor astrocitário. Astrócitos desempenhando funções neurotóxicas e neuroprotetoras podem ser encontrados em doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas, como a EM. Porém há prevalência de funções neurotóxicas nestas doenças. Fontes: Liddelow et al., 2017; Liddelow e Barres, 2017; Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019; Kwon e Koh, 2020; Escartin et al., 2021.

A classificação binária de astrócitos neurotóxicos e neuroprotetores pode ser considerada uma simplificação excessiva, uma vez que há perfis intermediários de astrócitos que podem desempenhar tanto funções de reparo quanto de dano tecidual (Liddelow e Barres, 2017; Escartin et al., 2021). De qualquer forma, estudos que investigam diferentes funções astrocitárias ajudam na compreensão de como estas células atuam em diferentes doenças neurológicas. No contexto inflamatório da EM, podem ser observadas tanto funções neurotóxicas, quanto neuroprotetoras em

astrócitos, mas as neurotóxicas prevalecem, agravando a desmielinização inflamatória da doença (Ponath et al., 2018; Yi et al., 2019).

Intervenções farmacológicas capazes de modular fenótipos astrocitários favorecendo funções neuroprotetoras em detrimento de neurotóxicas seriam muito úteis para o tratamento de várias doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas. No caso da EM, tais intervenções poderiam atenuar a fisiopatologia da doença de maneira direcionalizada.

#### 1.4 - Fingolimode

As terapias medicamentosas utilizadas na clínica para o tratamento da EM se baseiam na administração de fármacos imunossupressores, com mecanismos de ação principalmente relacionados à regulação da atividade de linfócitos T e B (Kunkl et al., 2020; Hauser et al., 2020; Kamma et al., 2022). Alguns dos mecanismos farmacológicos se baseiam na neutralização de linfócitos B, outros na redução da apresentação antigênica para linfócitos T, na inibição da adesão de linfócitos T nas células endoteliais da BHE, ou até na indução de linfócitos T anti-inflamatórias (Hauser et al., 2020). A **tabela 1** apresenta alguns dos fármacos utilizados e como atuam sobre linfócitos.

**Tabela 1 - Tipos de fármacos utilizados no tratamento de EM.** Fonte: Hauser et al., 2020.

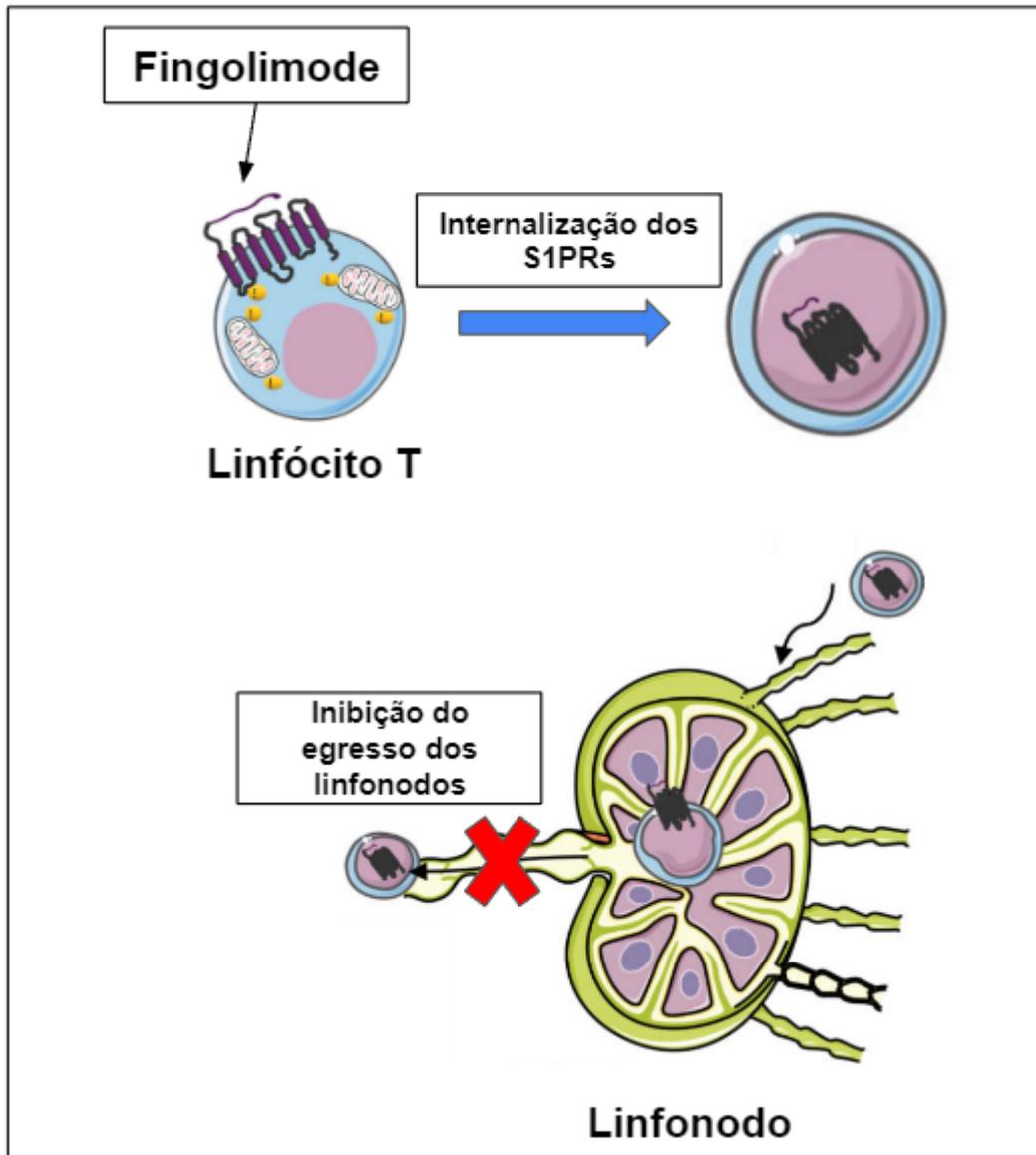
Nome comercial do medicamento	Mecanismo farmacológico
Interferon $\beta$	Inibe a expressão de moléculas de MHC, reduzindo a ativação de células T
Acetato glaratiramer	Estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias, reduzindo ativação de células T e B
Ocrelizumab	Anticorpo monoclonal neutralizante de células B expressando CD20
Teriflunomide	Inibe a proliferação de linfócitos T autorreativos
Natalizumab	Anticorpo monoclonal contra a integrina $\alpha 4\beta 1$ . Inibe a adesão de linfócitos T e B em células endoteliais

A ação destes fármacos não é capaz de curar a EM, mas atenuam o processo inflamatório, reduzindo a frequência dos surtos desmielinizantes e retardando a evolução para quadros progressivos da doença. Como tais medicamentos inibem a atividade de linfócitos, existem efeitos colaterais relacionados à linfopenia, tornando

os pacientes imunossuprimidos e suscetíveis à infecções por patógenos (Kunkl et al., 2020; Hauser et al., 2020; Kamma et al., 2022).

Em 2010 foi aprovado um fármaco que se mostrou particularmente eficiente na redução da inflamação mediada por linfócitos T (Brinkmann et al., 2010). O Fingolimode (FTY720/Gilenya/Novartis) é derivado de uma molécula anti-inflamatória chamada miriocina (Adachi et al., 1995; Brinkmann et al., 2010). As primeiras descrições da ação do fármaco foram em modelos de transplante de órgãos, onde as taxas de rejeição eram reduzidas com o medicamento (Adachi et al., 1995; Chiba et al., 1998; Brinkmann et al., 2001; Brinkmann et al., 2010). Desde que foi aprovado para o tratamento de EM, passou a ser uma das primeiras opções terapêuticas em diversos países (Brinkmann et al., 2010; Cohen et al., 2010; Cartier e Hla, 2019).

O mecanismo de ação do fármaco se baseia na retenção dos linfócitos nos linfonodos, impedindo que migrem para o SNC. O mecanismo de ação responsável por este efeito se dá através da ligação do Fingolimode com os receptores de esfingosina-1-fosfato do tipo 1, 3, 4 e 5 (S1PR1, 3, 4 e 5) presentes nos linfócitos. A ligação com os S1PRs resulta na internalização e degradação dos receptores, em um processo denominado antagonismo funcional. A redução dos S1PRs inibe a ligação com seu ligante endógeno, esfingosina-1-fosfato (S1P), cuja via de sinalização é requisito para a saída dos linfócitos dos linfonodos (Brinkmann et al., 2010; Cartier e Hla, 2019; Kleijn e Martens, 2020) (**Figura 3**).



**Figura 3 - Mecanismo de ação do Fingolimode sobre linfócitos T.** Imagem demonstra a ação do Fingolimode sobre os S1PRs de linfócitos T, promovendo sua internalização. Sem a via de sinalização por S1PRs, o egresso de linfócitos dos linfonodos é inibida, impedindo que migrem para o SNC de pacientes com EM. Fonte: Adaptado de Cartier e Hla, 2019.

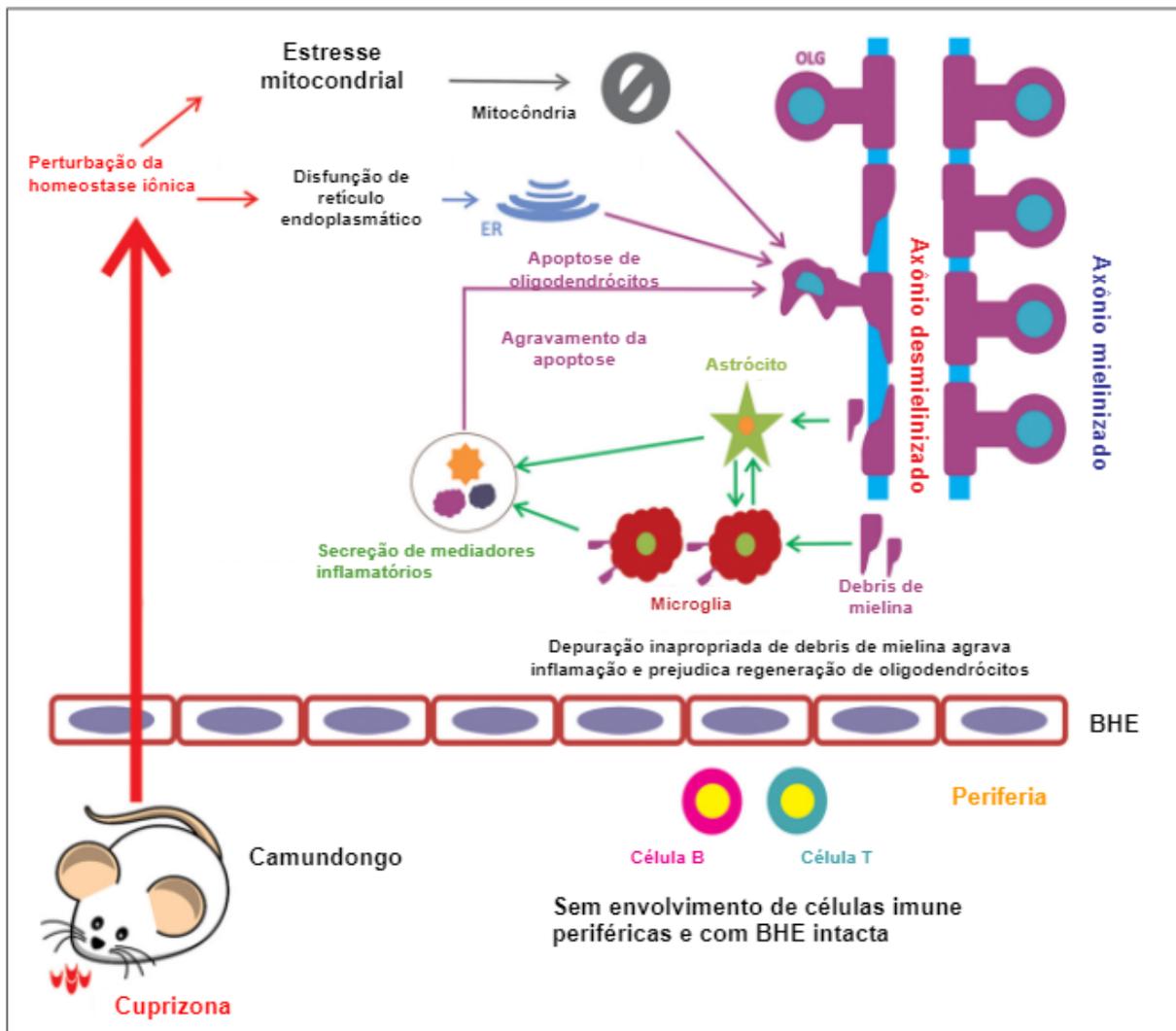
Os S1PRs também estão presentes em outras células, e recentemente foi observado que as células residentes do SNC, incluindo astrócitos, também expressam os receptores, sobretudo S1PR1 e S1PR3 (Farez e Correale, 2016; Kim et al., 2017; Shang et al., 2020). Foi também mostrado que o Fingolimode, quando fosforilado pela enzima esfingosina quinase, cruza a BHE alcançando o parênquima do SNC (Kim et al., 2017; Shang et al., 2020). Sendo assim, astrócitos seriam um potencial alvo terapêutico do Fingolimode.

### 1.5 - Modelo de desmielinização por Cuprizona

Modelos experimentais que reproduzem, em animais, eventos semelhantes aos que ocorrem na EM, são muito úteis para a compreensão da doença. Entre os modelos utilizados, listam-se quatro linhas distintas: Modelos genéticos (camundongos transgênicos com deleções em vias de produção de mielina); modelos de indução autoimune da desmielinização, exemplificada pelo modelo mais utilizado, encefalomielite autoimune experimental (EAE); desmielinização induzida por vírus, como o vírus de encefalomielite murina de Theiler; e os modelos de desmielinização por intoxicação, como o modelo de Cuprizona (Vega-Riquer et al., 2019). 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.

O modelo utilizado em nosso trabalho é o modelo de desmielinização induzida por Cuprizona, ou simplesmente modelo de Cuprizona. A Cuprizona (bis-ciclohexanona oxaldihidrazona) é uma droga quelante de cobre capaz de perturbar a homeostase iônica celular, induzindo apoptose por estresse mitocondrial (Vega-Riquer et al., 2019; Sen et al., 2019). A depender das concentrações de Cuprizona administradas em camundongos, pode-se gerar danos severos em vários órgãos, principalmente ao fígado, resultando em letalidade (Palumbo e Pellegrini, 2017; Vega-Riquer et al., 2019). No entanto, foi demonstrado que a alimentação de camundongos com Cuprizona, na concentração de 0,2% em relação ao peso da ração, gera morte seletiva de oligodendrócitos no encéfalo e na medula espinal, sem prejuízos significativos para outros órgãos. Seguindo a morte oligodendrocítica ocorre o processo de desmielinização e ativação inflamatória de astrócitos e microglia, mimetizando a neuroinflamação desmielinizante característica da EM. (Skripuletz et al., 2011; Vega-Riquer et al., 2019)

Um detalhe particularmente importante sobre o modelo de Cuprizona para o nosso trabalho é o fato de que a desmielinização inflamatória que ocorre não induz quebra da BHE ou infiltração de células imune periféricas (Sen et al., 2019). Sendo assim, o modelo permite o estudo da participação das células residentes, como microglia e astrócitos, de maneira isolada. A **figura 4** esquematiza como ocorre a desmielinização inflamatória no modelo. Como o nosso trabalho se propôs a analisar aspectos inflamatórios e neuroprotetores de astrócitos, o modelo de Cuprizona se apresenta como estratégia metodológica pertinente.



**Figura 4 - Desmielinização inflamatória induzida por Cuprizona.** Imagem demonstra os efeitos da intoxicação por Cuprizona no SNC de camundongos. A droga induz apoptose de oligodendrócitos, gerando desmielinização e ativação inflamatória de astrócitos e microglia, sem haver quebra da BHE ou infiltração de células periféricas. Fonte: Traduzido de Sen et al., 2019.

Estudos do fármaco em EAE são mais comuns, muito pela descrição da ação do medicamento sobre as células T, que possuem papel central no modelo (Choi et al., 2011; Colombo et al., 2014; Smith et al., 2018; Zha et al., 2021). No entanto, poucos são os trabalhos que analisaram os efeitos do Fingolimode em modelo de Cuprizona. Além disso, a região anatômica mais estudada no modelo é o corpo caloso, região de substância branca (Kim et al., 2017; Ziser et al., 2017; Mitra et al., 2022). Investigações acerca dos efeitos do Fingolimode em regiões corticais são necessárias, pois o córtex é uma região extremamente importante para o processamento sensorial e cognitivo (Purves et al., 2010). Neste sentido, nosso trabalho busca avaliar os efeitos do fármaco no córtex visual, uma vez que esta região é crucial para o processamento de informações visuais e é afetada pela EM e

por seus modelos experimentais (Graham e Klistorner, 2016; Espírito-Santo et al., 2021; Cooray et al., 2019).

Alguns estudos já demonstraram que o Fingolimode foi capaz de reduzir a reatividade astrocitária em modelos de EM, retomando um fenótipo homeostático (Kim et al., 2017; Doolen et al., 2018). Mas, até o momento, não se encontram estudos que caracterizem marcadores específicos de astrócitos neurotóxicos ou neuroprotetores sob efeito do Fingolimode em córtex visual no modelo de Cuprizona. Sendo assim, acreditamos que nosso trabalho pode contribuir para a compreensão de como um fármaco antes reconhecido por sua ação periférica, pode afetar diretamente astrócitos e modular fenótipos astrocitários em um modelo de desmielinização inflamatória.

## **2 - Objetivos**

### **2.1 - Objetivo Geral**

Caracterizar fenótipos de reatividade astrocitária induzidos por Cuprizona e sob influência do Fingolimode no córtex visual de camundongos.

### **2.2 - Objetivos Específicos**

- Validar o modelo através de marcação de MBP (mielina), avaliando os efeitos do Fingolimode sobre esse marcador;
- Investigar a reatividade astrocitária através da análise da expressão de GFAP;
- Avaliar indicador de fagocitose astrocitária através da co-marcação de LAMP1 com GFAP;
- Investigar marcador de astrócitos neurotóxicos por co-marcação de C3 com GFAP;
- Estudar marcador anti-inflamatório em astrócitos por co-marcação de Arg1 e GFAP;
- Avaliar a expressão de fator neuroprotetor astrocitário por co-marcação de BDNF e GFAP.

## **3 - Materiais e Métodos**

### **3.1 - Animais**

Foram utilizados camundongos suícos (*mus musculus*) machos de 5 semanas de idade. Durante toda a experimentação os camundongos foram mantidos em

gaiolas (no máximo 5 por gaiola), em temperatura controlada (22 a 23°C), sob ciclos de 12/12 hs de claro e escuro com luz artificial. Tiveram livre acesso à água e alimentação com ração comercial triturada. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), sob número de protocolo 5068.

### 3.2 - Tratamentos

Os camundongos foram divididos em três grupos: grupo controle (CTL); grupo Cuprizona (CUP); e grupo Fingolimode (FING). O CTL foi alimentado com ração comercial triturada por 5 semanas, recebendo injeções intraperitoneais diárias de solução veículo (dimetil sulfóxido (DMSO) a 1  $\mu$ L/g de animal diluído em 200  $\mu$ L de solução salina (0,9% de NaCl em água destilada)). O CUP foi alimentado durante as 5 semanas com ração triturada contendo 0,2% de Cuprizona (Sigma-Aldrich), recebendo injeções diárias de solução veículo. E o FING foi alimentado com ração comercial triturada contendo 0,2% de Cuprizona, recebendo injeções intraperitoneais diárias de Fingolimode na concentração de 1 mg/Kg de animal. Para o preparo das injeções do FING, estoques prévios de Fingolimode (Gilenya/Novartis) foram preparados na concentração de 1 mg/mL em DMSO. Em seguida, o estoque foi diluído na concentração de 1  $\mu$ L/g de animal em 200  $\mu$ L de solução salina (0,9% de NaCl em água destilada). A **figura 5** ilustra os detalhes dos tratamentos.



**Figura 5 - Tratamento dos animais.** Ilustração de como foram realizados os tratamentos por 5 semanas com os animais dos grupos: controle (CTL); alimentados com Cuprizona e tratados com veículo (CUP); e alimentados com Cuprizona e injetados com (FING).

### 3.3 - Preparo histológico

Ao final das 5 semanas de tratamento, os animais foram anestesiados através da injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/Kg de animal) + xilazina (75 mg/Kg de animal). A avaliação do efeito da anestesia se deu através da testagem do reflexo podal. O procedimento só seguia quando não havia sinais desse reflexo. Em seguida, os animais foram submetidos à perfusão cardíaca com paraformaldeído 4% em PBS (PFA 4%) para fixação dos tecidos. Após 20 minutos de perfusão, os camundongos foram decapitados e os encéfalos removidos. Os encéfalos foram mantidos em solução de PFA 4% por 24 hs à 4°C para pós-fixação e, em seguida transferidos para solução crioprotetora de sacarose 20% em PBS, onde se mantiveram por 24 hs à 4°C. Cada encéfalo foi emblocado utilizando gel crioprotetor (Tissue Tek O.C.T. Compound - Sakura) e, então, congelado utilizando nitrogênio líquido. Os encéfalos foram mantidos em freezer (-20°C) até o momento da realização dos cortes. Os cortes histológicos foram realizados na orientação coronal em criomicrotomo (Leica CM 1860 UV) na temperatura de -25°C, com espessura de 14 µm. Os cortes foram adquiridos sob orientação do atlas de encéfalo de camundongo (Allen Brain Atlas) desde a região mais caudal contendo o córtex visual até não mais ser observado o córtex visual. Os cortes foram fixados em lâminas para histologia pré-gelatinizadas. As lâminas contendo os cortes foram armazenadas em freezer (-20°C).

### 3.4 - Imunofluorescência

Os cortes utilizados para os experimentos de imunofluorescência foram de diferentes alturas contendo o córtex visual. Todo o procedimento da imunofluorescência foi realizado em câmara úmida para evitar o ressecamento dos cortes. Os cortes foram submetidos à 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X (50 µL por corte). Em seguida, foram submetidos a protocolo de recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) por 30 minutos à temperatura entre 90-95°C. Foram realizadas mais 3 lavagens de 5 minutos cada com PBS 1X. Os cortes foram incubados em solução bloqueio (albumina de soro bovino - BSA 3%; soro normal de cabra - NGS 5%; Triton 0,3%; PBS 1X) por 1h30min. Em seguida foram incubados *overnight* à 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução bloqueio. A **tabela 2** apresenta os anticorpos primários utilizados e suas respectivas diluições. Em seguida os cortes foram lavados 3 vezes por imersão com PBS 1X (5 minutos cada lavagem). Foram incubados com os anticorpos secundários diluídos em solução bloqueio por 1h30min. A **tabela 3** lista os anticorpos secundários utilizados e suas

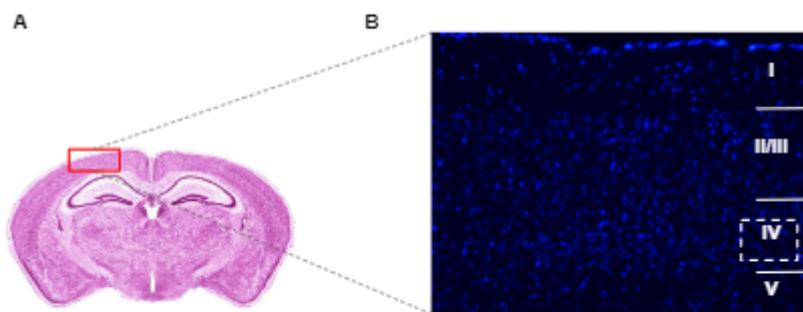
respectivas diluições. Os cortes foram submetidos a mais 3 lavagens por imersão em PBS 1X. Cada corte recebeu 10 µL do meio de montagem ProLong Gold contendo DAPI (Invitrogen) e, então, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e seladas com esmalte. As lâminas montadas foram mantidas à temperatura ambiente e no escuro *overnight* para o meio de montagem se polimerizar. Em seguida, as lâminas foram armazenadas no freezer (-20°C) até o momento da observação em microscópio. As observações e captura das imagens se deram no córtex visual e na camada IV do córtex visual, utilizando microscópio de fluorescência (Zeiss), em aumentos de 10X, 40X e 63X, dependendo da marcação realizada. Para cada corte, a quantidade de campos capturados variou dependendo do aumento. Em aumento de 10X foram capturados dois campos distintos (um em cada hemisfério encefálico). E em aumentos de 40X e 63X foram capturados quatro campos distintos (dois em cada hemisfério encefálico). A **figura 6** ilustra a região analisada.

**Tabela 2 - Anticorpos primários**

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem</b>	<b>Fabricante (código de referência)</b>	<b>Diluição</b>
anti-MBP	mouse	Bio Rad (MCA70)	1:10
anti-GFAP	chicken	Invitrogen (PA110004)	1:400
anti-LAMP1	rat	Santa Cruz (sc-19992)	1:100
anti-C3	rat	Novus Biologicals (NB200-540)	1:100
anti-Arg1	mouse	Santa Cruz (sc-271430)	1:50
anti-BDNF	rabbit	Sigma (SAB2108004)	1:100

**Tabela 3 - Anticorpos secundários**

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem</b>	<b>Fabricante (código de referência)</b>	<b>Diluição</b>
anti-mouse Alexa 546	goat	Invitrogen (A11003)	1:1000
anti-chicken Alexa 488	goat	Invitrogen (A11039)	1:500
anti-rat Alexa 546	goat	Invitrogen (A11081)	1:1000
anti-rabbit Alexa 594	donkey	Invitrogen (A21207)	1:1000



**Figura 6 - Região analisada nas imunofluorescências.** (A) Imagem de corte coronal de encéfalo de camundongo corado por coloração de Nissl. Retângulo vermelho indica a região de interesse para o nosso trabalho (córtex visual). (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.

### 3.5 - Processamento e quantificação das imagens

As imagens capturadas foram processadas utilizando o software FIJI (ImageJ). As imagens foram transformadas em 16 bit (escala de cinza) e processadas utilizando a ferramenta “Threshold”, reduzindo o máximo de *background* e mantendo o máximo de marcação perceptível. Quando a quantificação foi para um único canal (marcação de 1 marcador), após o processamento a quantificação da marcação foi realizada para o parâmetro de densidade integrada. No caso de quantificação de co-localização (marcação com 2 marcadores), foram realizados os processamentos para os dois canais. Após o processamento de cada canal, as duas imagens foram transformadas novamente para suas devidas cores (verde ou vermelho) através da ferramenta “Channels Tool”. Os canais verde e vermelho foram sobrepostos através da ferramenta “Merge Channels”. A imagem sobreposta foi transformada para o formato RGB. Para selecionar as marcações co-localizadas, utilizou-se a ferramenta “Color Threshold”, na janela de 1 até 84, mantendo destacadas apenas as regiões em amarelo (coincidência entre verde e vermelho). Uma vez selecionadas as co-localizações, foi realizada a quantificação de densidade integrada. Os valores referentes a cada animal foram considerados através da média das quantificações de cada campo.

### 3.6 - Análises estatísticas

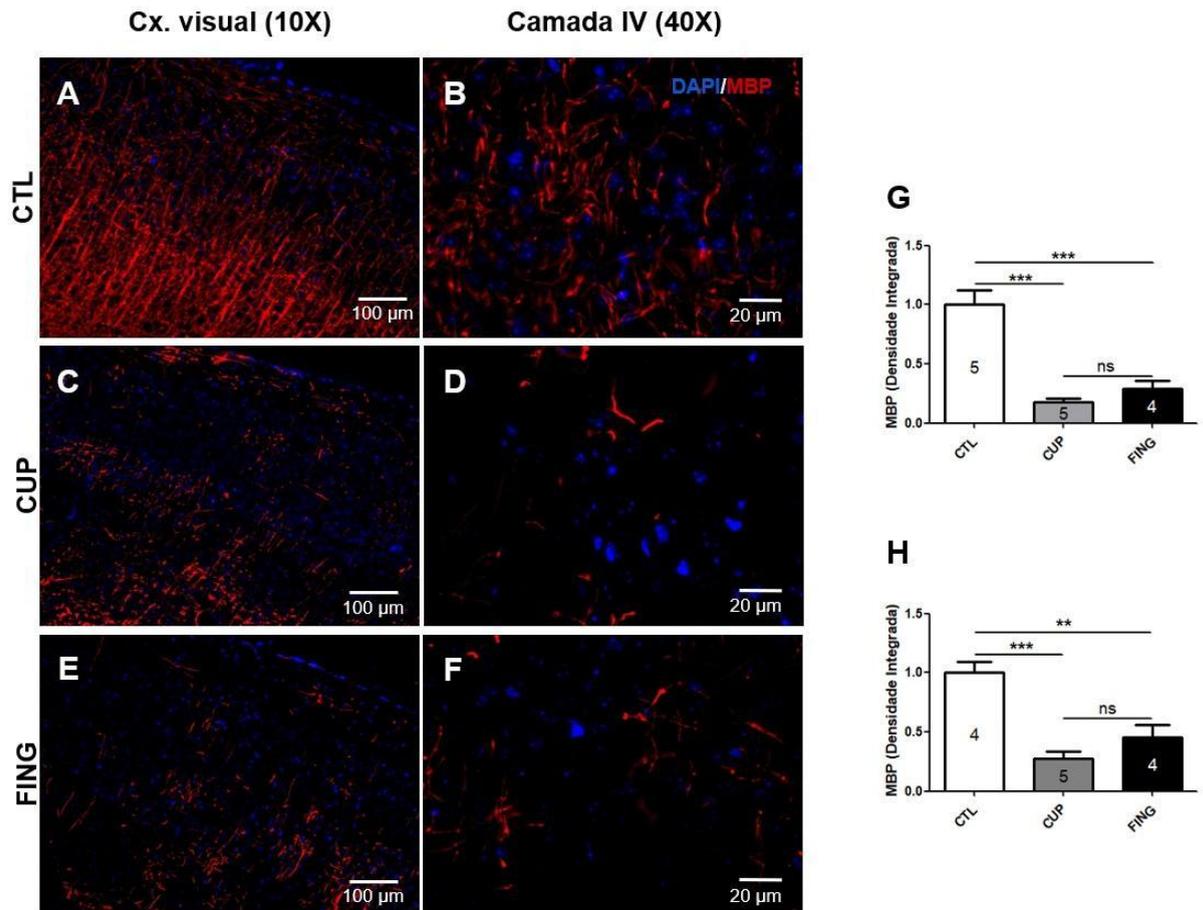
As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5. Os valores das quantificações foram adicionados à tabela de dados e as análises foram realizadas utilizando o teste One Way A-NOVA, com *post test* de Tukey para

múltiplas comparações. Os gráficos foram gerados no formato de colunas, evidenciando os desvios padrões, a significância estatística e os n amostrais.

## 4 - Resultados

### 4.1 - O Fingolimode não reverte a perda de MBP observada no modelo de cuprizona

A principal marca histológica do modelo de cuprizona é a desmielinização e inflamação no SNC (Vega-Riquer et al., 2019). Uma forma de se mensurar grau de mielinização é através da análise de proteínas associadas à mielina. A proteína básica de mielina (MBP) é utilizada como marcador de mielinização em muitos trabalhos em modelo de Cuprizona (Skripuletz et al., 2008; Vega-Riquer et al., 2019; Kim et al., 2017; Mitra et al., 2022). Realizamos imunofluorescência para a proteína básica de mielina (MBP) para validar o modelo e avaliar se o Fingolimode modula a expressão desta proteína neste contexto. Queda robusta da imunomarcagem para MBP foi observada no grupo intoxicado por Cuprizona tratado com solução veículo (CUP), em relação ao grupo controle (CTL) no córtex visual (**Figura 7, A-D**). A administração de Fingolimode não foi capaz de reverter esta queda, mantendo, no grupo tratado (FING), os níveis de MBP observados em CUP. (**Figura 7, C-F**). As quantificações da densidade integrada de imunomarcagem para MBP confirmaram essas observações. (**Figura 7, G e H**). Como a desmielinização foi mais pronunciada nas camadas mais profundas (IV e V), analisamos separadamente os efeitos do tratamento na camada IV. Os achados na camada IV reproduziram os resultados no córtex visual total.

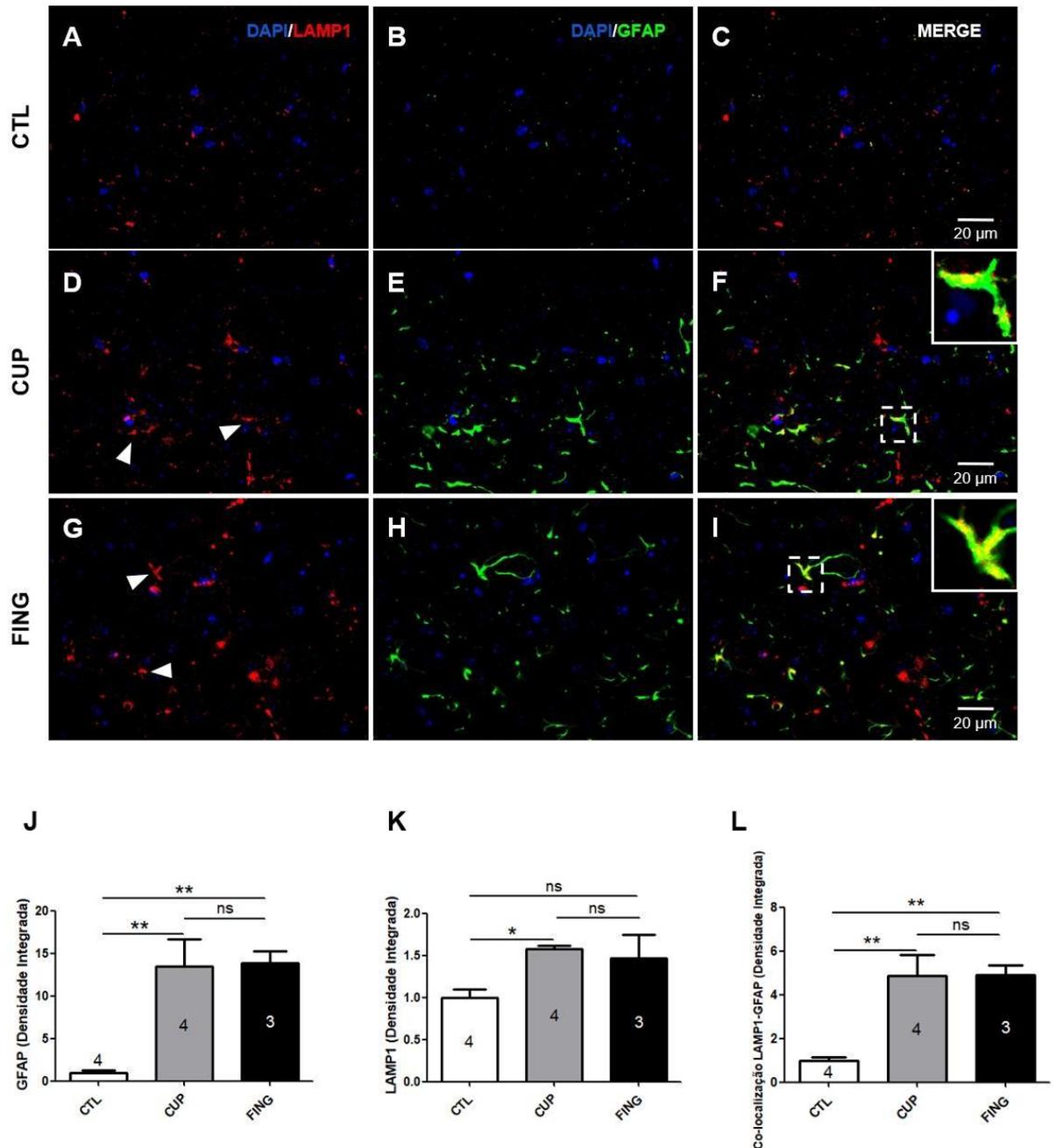


**Figura 7 - Imunofluorescência para MBP no córtex visual dos camundongos.** (A, C e E) Imagens representativas de imunofluorescência para MBP no córtex visual em aumento de 10X, entre os grupos CTL, CUP e FING, respectivamente. (C, D e F) Imagens representativas da imunomarcagem na camada IV em aumento de 40X, dos grupos CTL, CUP e FING, respectivamente. Queda da marcação para MBP (vermelho) é observada em CUP e em FING, comparando ao CTL. Observação se reproduziu no córtex visual e na camada IV. (G e H) Quantificação da densidade de marcação das imagens do córtex visual e da camada IV, respectivamente. Os gráficos (H, I) evidenciam a diminuição significativa da marcação nos grupos CUP e FING em relação ao CTL, sem diferença estatística entre as marcações dos grupos CUP e FING. (A-F) Núcleo das células marcados em azul com DAPI e marcações de MBP em vermelho. Número amostral indicado em cada barra dos gráficos (G) (CTL, n=5; CUP, n=5; FING, n=4) e (H) (CTL, n=4; CUP, n=5; FING, n=4). ns (não significativo); \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.2 - Reatividade astrocitária e LAMP1 astrocitário são aumentados no córtex visual no modelo de cuprizona, sem sofrer alteração após Fingolimode

Tendo em vista que a desmielinização no córtex visual foi mais pronunciada nas camadas profundas, utilizamos a camada IV, uma das mais afetadas, para os demais experimentos. Em condições homeostáticas os astrócitos corticais em camundongos expressam baixos níveis da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Zhang et al., 2019; Escartin et al., 2021). Já em condições inflamatórias, como ocorre em modelo de Cuprizona, a expressão de GFAP é aumentada pelos astrócitos (Liddel et al., 2017; Escartin et al., 2021), indicando fenótipo reativo. Realizamos

imunofluorescência para GFAP para avaliar a reatividade astrocitária no córtex visual sob efeito do Fingolimode. A imunomarcagem para GFAP aumentou drasticamente em CUP comparado ao CTL, e se manteve aumentada em FING (Figura 8, B, E e H). O gráfico de densidade integrada evidencia os aumentos significativos da marcação em CUP e em FING em relação ao CTL, sem diferença estatística entre FING e CUP (Figura 8, J).



**Figura 8 - Imunofluorescência para GFAP e LAMP1 na camada IV do córtex visual dos camundongos.** (A-I) Imagens representativas de imunofluorescência para LAMP1 e GFAP. As imagens A, B e C correspondem ao grupo CTL nos canais vermelho (LAMP1), verde (GFAP) e da sobreposição (MERGE), respectivamente. (D, E, F) Imagens correspondem ao grupo CUP para os

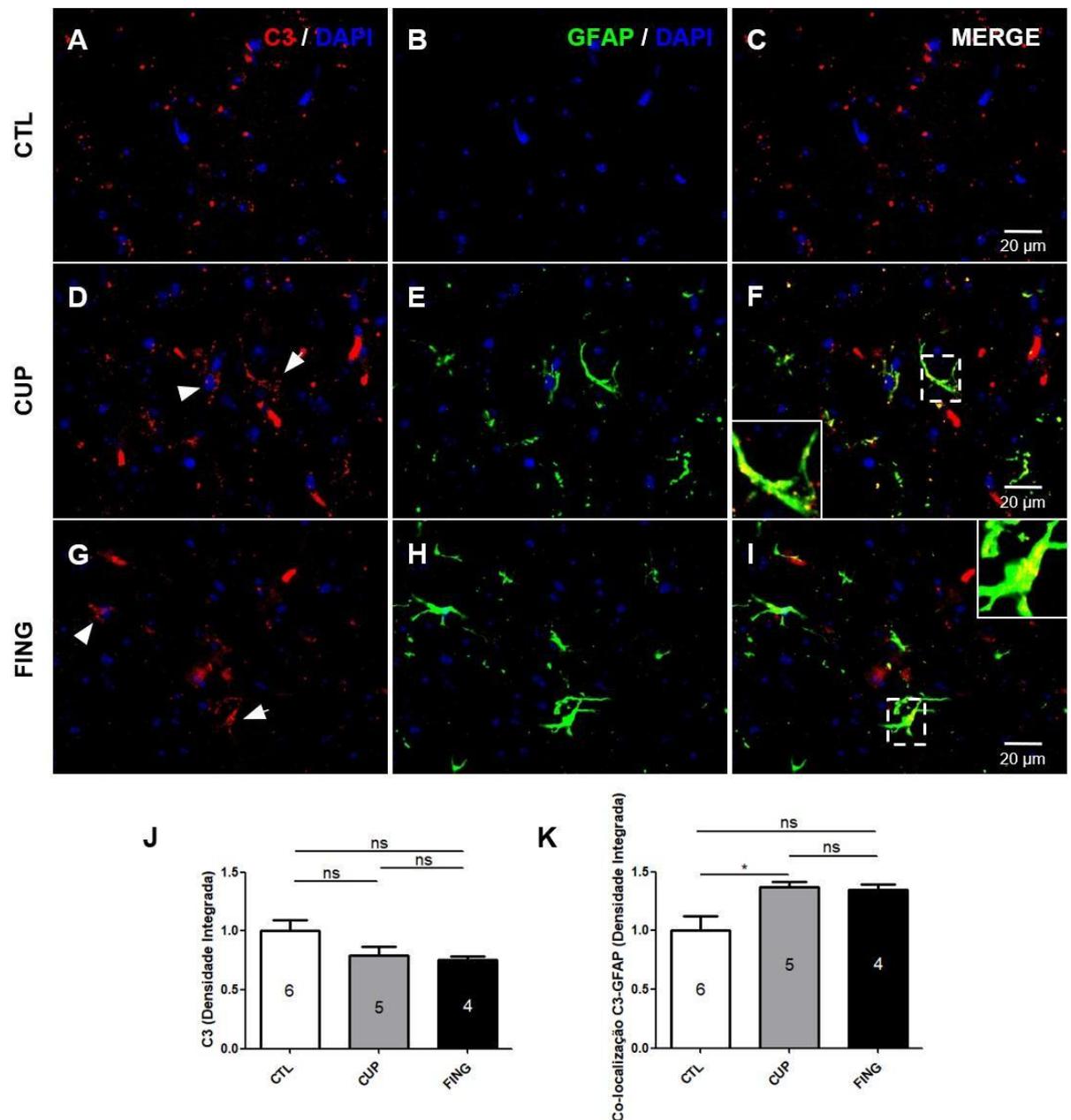
mesmos canais. (G, H e I) Imagens correspondem ao grupo FING para os mesmos canais. (B, E e H) Imagens demonstram aumento das marcações para GFAP em CUP e FING, em relação ao CTL. (J) Quantificação da densidade integrada de GFAP indicando aumentos significativos das marcações em CUP relativo à CTL e em FING relativo ao CTL. Sem diferença estatística entre FING e CUP. (A, D e G) Imagens demonstram marcação para LAMP1 nos diferentes grupos, com aumento de marcação de LAMP1 astrocitário (cabeças de seta) em CUP e FING, comparados ao CTL. (K) Quantificação da densidade integrada de marcação para LAMP1 indica aumento em CUP relativo ao CTL, sem diferenças estatísticas entre FING e CTL e entre FING e CUP. (C, F e I) Imagens da sobreposição entre os canais, para os diferentes grupos. Aumento da co-localização entre LAMP1 e GFAP é nítido em CUP e FING comparados ao CTL. *Insets* (áreas dos quadrados tracejados) evidenciam a co-localização de LAMP1 em astrócitos (amarelo). (L) Quantificação da densidade integrada da marcação co-localizada. Co-localização aumenta significativamente em CUP e em FING, relacionados ao CTL. Não houve diferença estatística entre FING e CUP. (A-I) Núcleo das células marcados em azul com DAPI, marcações de LAMP1 em vermelho, e marcações de GFAP em verde. Número amostral indicado nas barras dos gráficos (J) (CTL, n=4; CUP, n=4; FING, n=3), (K) (CTL, n=4; CUP, n=4; FING, n=3) e (L) (CTL, n=4; CUP, n=4; FING, n=3). ns (não significativo); \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Paralelamente, investigamos os níveis da proteína lisossomal LAMP1 em astrócitos. O aumento de LAMP1 astrocitário já foi relacionado com a atividade fagocítica de astrócitos em EM (Ponath et al., 2017; Ponath et al., 2018). No entanto, LAMP1 astrocitária ainda não foi investigada em modelo de Cuprizona. Sendo assim, investigamos a expressão de LAMP1 em astrócitos, imunomarcados para GFAP, entre os grupos. No córtex visual foi perceptível o aumento da marcação de LAMP1 sozinho em CUP em relação ao CTL, enquanto que não foi detectada diferença entre o FING e os demais grupos (**Figura 8**, A, D e G), o que foi confirmado pela quantificação (**Figura 8**, K). A análise de sobreposição entre as imunomarcações de LAMP1 e GFAP, demonstrou aumento do LAMP1 astrocitário nos grupos CUP e FING em relação ao CTL, sem diferença perceptível entre FING e CUP (**Figura 8**, C, F e I). A quantificação da densidade integrada confirmou essas observações (**Figura 8**, L).

#### **4.3 - C3 astrocitário é aumentado no córtex visual no modelo de cuprizona, e não sofre alteração após tratamento com Fingolimode**

Um marcador clássico de astrócitos neurotóxicos é a proteína do complemento C3 (Liddel et al., 2017). Sendo assim, realizamos imunofluorescência contra C3 e GFAP para avaliar os níveis de co-localização entre os grupos. O C3 total no tecido não variou entre os grupos (**Figura 9**, A, D e G), o que é evidenciado pela quantificação da densidade integrada da marcação (**Figura 9**, J). As imagens sobrepostas demonstram co-localização entre C3 e GFAP nos grupos CUP e FING. Mas a quantificação da densidade integrada das co-marcações indica aumento significativo apenas em CUP relativo ao CTL. Em

FING não houveram diferenças estatísticas em relação ao CTL e ao CUP (Figura 9, K).

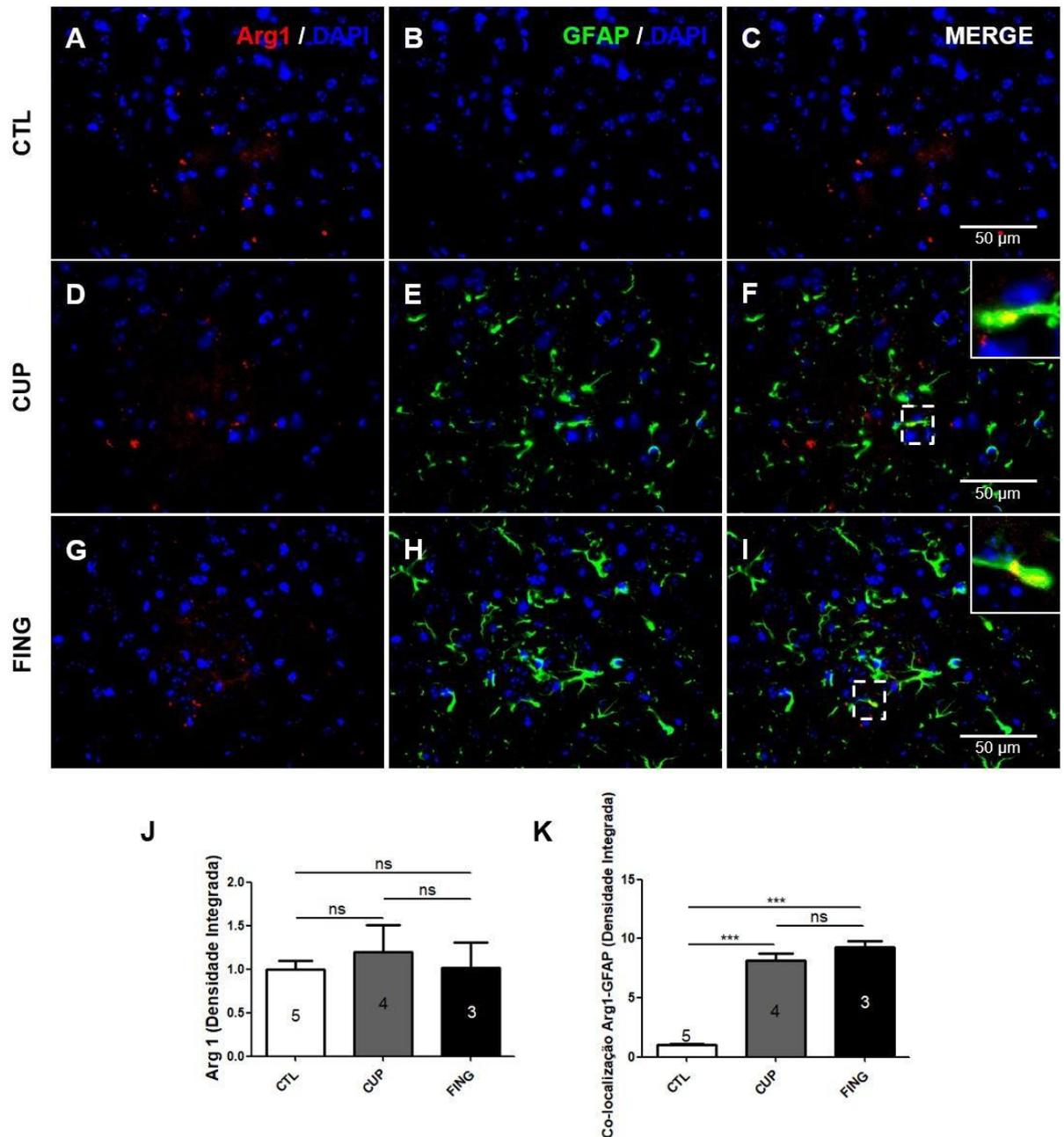


**Figura 9 - Imunofluorescência para C3 e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.** (A-I) Imagens representativas de imunofluorescência para C3 e GFAP. Imagens A, B e C correspondem ao grupo CTL nos canais vermelho (C3), verde (GFAP) e da sobreposição (MERGE), respectivamente. Imagens D, E e F correspondem ao grupo CUP para os mesmos canais. Imagens G, H e I correspondem ao grupo FING para os mesmos canais. Imagens demonstram níveis similares de C3 entre os grupos (A, D e G), com astrócitos marcados para C3 nos grupos CUP e FING (cabeças de seta). (J) Quantificação de densidade integrada de marcação para C3 não indicando diferenças significativas entre os grupos. (F e I) Imagens demonstram co-localização (amarelo) de C3 no inset no MERGE (área do quadrado tracejado) em astrócitos nos grupos CUP e FING. (K) Quantificação da densidade integrada da marcação co-localizada demonstra aumento significativo no CUP em relação ao CTL sem diferença estatística entre FING e CTL, e FING e CUP. (A-I) Núcleo das células marcados em azul com DAPI. Número amostral indicado nas barras dos

gráficos (J ) (CTL, n=6; CUP, n=5; FING, n=4) e (K) (CTL, n=6; CUP, n=5; FING, n=4). ns (não significativo); \* $P < 0,05$ .

#### **4.4 - Arg1 astrocitária é aumentada no córtex visual do modelo de Cuprizona aumenta e mantém níveis elevados após Fingolimode**

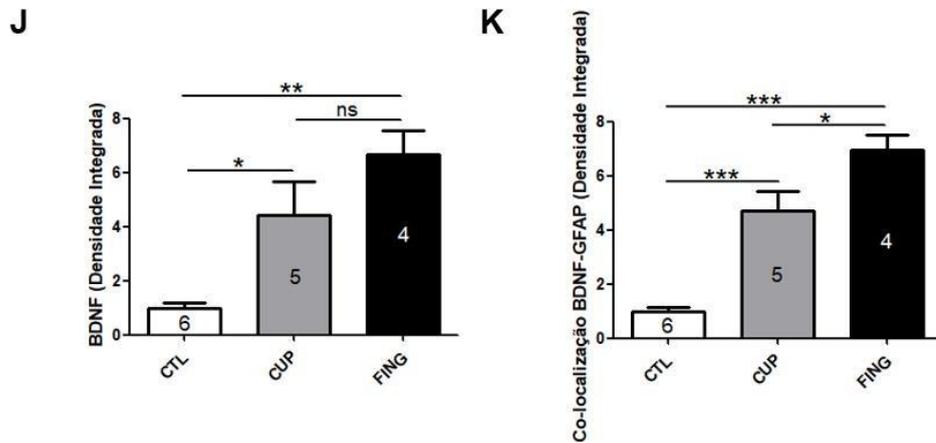
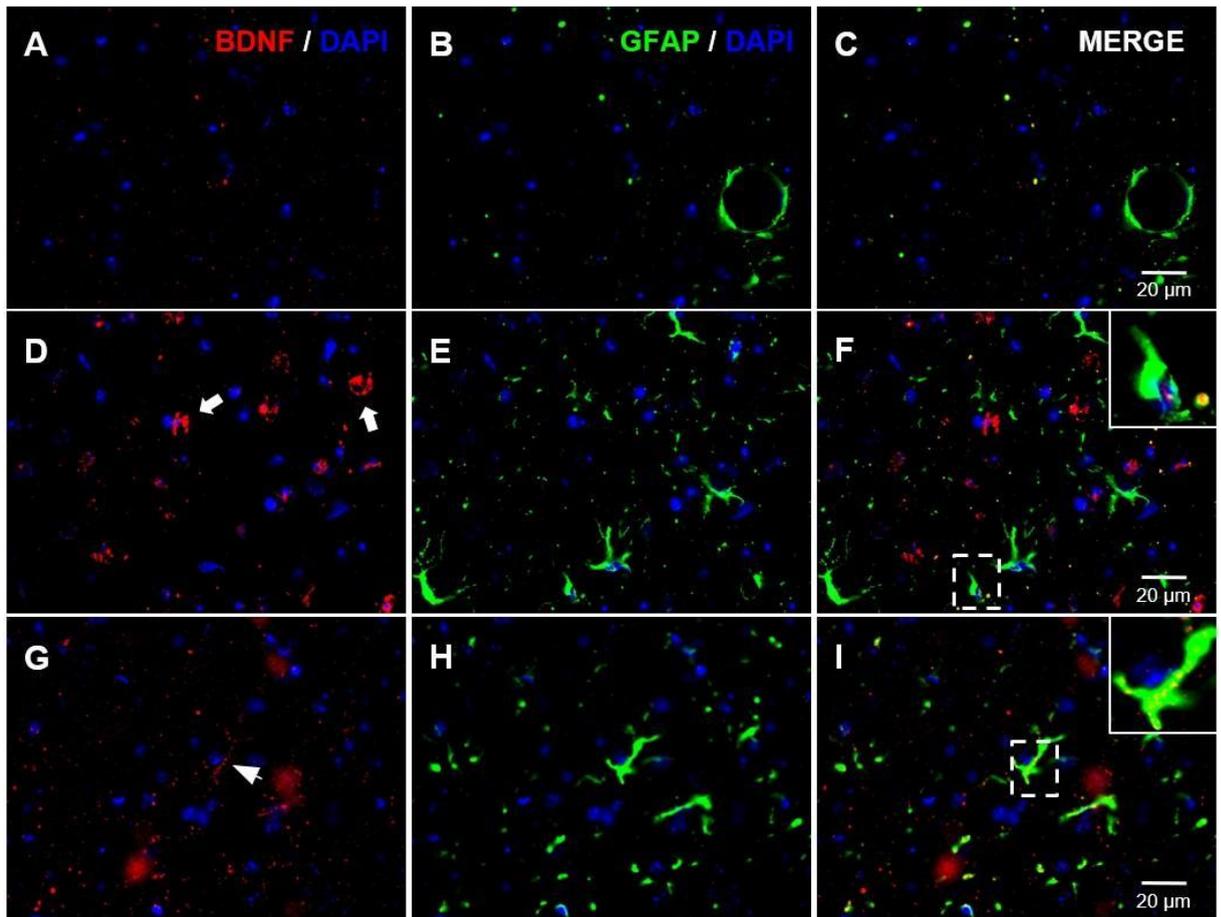
Arg1 é uma enzima muito expressa em condições inflamatórias, e sua ação geralmente resulta na redução da produção de NO, por competir com a iNOS pelo mesmo substrato (L-Arginina). A ação da Arg1 permite maior reparo tecidual e se relaciona com fenótipo neuroprotetor astrocitário. Realizamos imunofluorescência para Arg1 e GFAP para avaliar os níveis de Arg1 astrocitária entre os grupos. Os níveis totais de Arg1 no tecido não variaram entre os grupos (**Figura 10**, A, D e G), o que também é demonstrado pela quantificação da densidade integrada de marcação (**Figura 10**, J). Já a co-localização entre Arg1 e GFAP aumentou em CUP e em FING, se comparado ao CTL (**Figura 10**, C, F e I). A quantificação da co-localização evidencia o aumento em CUP e em FING, relativo ao CTL, sem diferença estatística entre FING e CUP (**Figura 10**, K).



**Figura 10 - Imunofluorescência para Arg1 e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.** (A-I) Imagens representativas de imunofluorescência para Arg1 e GFAP. As imagens A, B e C correspondem ao grupo CTL nos canais vermelho (Arg1), verde (GFAP) e da sobreposição (MERGE), respectivamente. (D, E e F) Imagens do grupo CUP nos distintos canais. (G, H e I) Imagens do grupo FING nos distintos canais. (A, D e G) Imagens demonstram níveis similares de Arg1 entre os grupos e (J) quantificação de densidade integrada da marcação evidencia isto. (C, F e I) Sobreposição dos canais demonstram maior co-localização de Arg1 em astrócitos (amarelo) nos grupos CUP e FING em relação ao CTL e *insets* evidenciam isto. (K) Quantificação da densidade integrada da marcação co-localizada apresenta aumentos significativos em CUP relativo ao CTL e em FING relativo ao CTL, sem diferença estatística entre CUP e FING. (A-I) Núcleo das células marcados em azul com DAPI, marcações para Arg1 em vermelho e marcações para GFAP em verde. Número amostral indicado nas barras dos gráficos (J) (CTL, n=5; CUP, n=4; FING, n=3) e (K) (CTL, n=5; CUP, n=4; FING, n=3). ns (não significativo); \*\*\*P< 0,001.

#### **4.5 - Fingolimode aumenta BDNF astrocitário no modelo de cuprizona**

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é muito importante para a sobrevivência neuronal e oligodendrocítica em contextos neurotóxicos, como na EM (Stadelmann et al., 2002; Fulmer et al., 2014; Sasi et al., 2017; Araki et al., 2020). Além disso, o BDNF astrocitário é crucial para a neuroproteção em condições neuropatológicas encontradas na EM e no modelo de cuprizona (Stadelmann et al., 2002; Fulmer et al., 2014). Com o intuito de avaliar a expressão de BDNF e inferir sobre o fenótipo astrocitário nos diferentes grupos, realizamos imunofluorescência contra BDNF e GFAP. Percebe-se que o BDNF total do tecido aumenta tanto no CUP em relação ao CTL, quanto no FING em relação ao CTL, sem diferença aparente entre FING e CUP (**Figura 11**, A, D e G). O mesmo é demonstrado pela quantificação da densidade integrada da marcação (**Figura 11**, J). Avaliando a co-localização entre BDNF e GFAP nota-se que houve um aumento significativo do BDNF astrocitário em CUP em relação ao CTL, e um aumento significativo em FING em relação ao CUP (**Figura 11**, C, F e I), com a quantificação da densidade integrada da marcação confirmando esse resultado (**Figura 11**, K).



**Figura 11 - Imunofluorescência para BDNF e GFAP na camada IV do córtex visual dos camundongos.** (A-I) Imagens representativas de imunofluorescência para BDNF e GFAP. As imagens A, B e C correspondem ao grupo CTL nos canais vermelho (BDNF), verde (GFAP) e da sobreposição (MERGE), respectivamente. (D, E e F) Imagens do grupo CUP nos distintos canais. (G, H e I) Imagens do grupo FING nos distintos canais. (A, D e G) Imagens demonstram aumento da marcação para BDNF no grupo CUP em relação ao CTL e no grupo FING em relação ao CTL. Setas indicam marcações morfológicamente similares à neurônios no grupo CUP e cabeças de seta indicam BDNF astrocitário em FING. (J) Quantificação da densidade integrada de marcação para BDNF demonstram aumentos significativos de marcação no CUP em relação ao CTL e no FING em relação ao CTL, sem diferença estatística entre as marcações de FING e CUP. (C, F e I) Sobreposição dos canais demonstram aumento da co-localização de BDNF em astrócitos no CUP em relação ao CTL e no FING em relação ao CTL. Co-localização no FING em relação ao CUP também aumenta. *Insets* evidenciam a co-localização (amarelo). (K) Quantificação da densidade integrada da co-localização entre BDNF e GFAP demonstram aumento significativo da marcação no CUP em relação ao CTL e no

FING em relação ao CTL. Também há aumento significativo no FING em relação ao CUP. (A-I) Núcleo das células marcados em azul com DAPI, marcações para BDNF em vermelho e marcações para GFAP em verde. Número amostral indicado nas barras dos gráficos (J) (CTL, n=6; CUP, n=5; FING, n=4) e (K) (CTL, n=6; CUP, n=5; FING, n=4). ns (não significativo); \*P< 0,05; \*\*P< 0,01; \*\*\*P< 0,001.

## 5 - Discussão

Investigar a participação astrocitária no modelo de Cuprizona é muito importante para a compreensão fisiopatológica e terapêutica no modelo e na EM. Além disso, embora na última década o Fingolimode venha sendo utilizado como imunomodulador para tratar a EM, ainda falta elucidar seus efeitos celulares específicos, sobretudo nas células residentes do SNC. Nosso trabalho buscou caracterizar fenótipos de reatividade astrocitária, acessando marcadores relacionados a funções neurotóxicas e neuroprotetoras, no modelo de Cuprizona e sob influência do Fingolimode. Nossas análises avaliaram fatores astrocitários relacionados à inflamação (LAMP1, C3 e Arg1) e um fator neurotrófico relacionado à neuroproteção (BDNF). Nossos resultados demonstraram que a desmielinização inflamatória induzida pela Cuprizona foi capaz de aumentar os níveis de todos os marcadores investigados, sobretudo quando co-localizados com os astrócitos. Apesar de não termos observado alterações nos aspectos inflamatórios investigados com a presença do Fingolimode, observamos aumento do BDNF astrocitário com o fármaco, sugerindo indução de um fenótipo astrocitário neuroprotetor.

Primeiramente buscamos avaliar se o Fingolimode era capaz de reverter a desmielinização induzida pelo modelo de Cuprizona por meio da imunomarcação para MBP. Demonstramos diminuição da mielinização em CUP, indicando que nosso modelo funcionou. Por outro lado, o Fingolimode não foi capaz de reduzir a perda de MBP induzida por Cuprizona. Comparando este resultado com outros quatro trabalhos (Ziser et al., 2017; Kim et al., 2017; Nystad et al., 2020; Mitra et al., 2022) que avaliaram a ação do Fingolimode em modelo de Cuprizona, percebe-se que dois deles (Ziser et al., 2017; Mitra et al., 2022) apresentam redução da desmielinização com o fármaco. Ziser e colaboradores (2017) avaliaram a ação do Fingolimode em camundongos C57BL/6 intoxicados por Cuprizona e demonstraram maiores níveis de MBP no corpo caloso dos animais tratados com o fármaco em relação aos não tratados. Outro estudo demonstrou que o Fingolimode reduz a desmielinização no corpo caloso de ratos Sprague-Dawley intoxicados por Cuprizona (Mitra et al., 2022).

Este achado não se deu através da análise de MBP, e sim por meio da coloração com Luxol Fast Blue, que cora regiões ricas em lipídio, como a mielina. Outro dos quatro estudos, também investigou o Fingolimode em modelo de Cuprizona, mas não realizou análises de desmielinização, e sim de prevenção de apoptose de oligodendrócitos (Kim et al., 2017). Os autores demonstraram uma redução da morte oligodendrocítica no corpo caloso de camundongos C57BL/6 intoxicados por Cuprizona e tratados com Fingolimode, em relação aos camundongos não tratados. Tal análise se deu com 3 semanas de tratamento por Cuprizona, quando percebe-se apoptose oligodendrocítica, mas ainda não se tem desmielinização severa (Skripuletz et al., 2008; Kim et al., 2017; Vega-Riquer et al., 2019). Nystad e colaboradores (2020) apresentaram resultados semelhantes ao nosso. Em suas análises, demonstraram que o Fingolimode não foi capaz de reverter a desmielinização induzida por Cuprizona. Tais análises se deram no corpo caloso e no córtex motor de camundongos C57BL/6, avaliando vários marcadores associados à mielina, incluindo MBP. Apesar das demais divergências metodológicas entre os trabalhos citados e o nosso, nota-se que os dois trabalhos em que o Fingolimode não reverteu a desmielinização (o nosso e o último citado), realizaram análises em regiões corticais (substância cinzenta). Enquanto que os demais analisaram o corpo caloso (substância branca). É possível que o fármaco possa apresentar ações heterogêneas entre diferentes regiões do SNC e que isso explique os diferentes resultados. Além disso, a própria desmielinização por Cuprizona também é heterogênea no cérebro, e que, regiões de substância branca, como o corpo caloso, são mais acometidas (Vega-Riquer et al., 2019). Diferentes linhagens murinas também diferem entre si acerca dos padrões de desmielinização por Cuprizona (Skripuletz et al., 2008). Portanto é possível que a utilização de diferentes linhagens entre os trabalhos também contribua para os resultados divergentes. De toda forma, nosso resultado também contribui para a compreensão sobre a desmielinização por Cuprizona no córtex visual com e sem intervenção farmacológica, o que, até o momento, é algo inédito na literatura.

Iniciando a caracterização astrocitária, analisamos imunomarcações para GFAP. Astrócitos corticais expressam baixos níveis de GFAP em condições homeostáticas (Zhang et al., 2019). Por outro lado, estímulos inflamatórios de diferentes naturezas podem aumentar significativamente a expressão da proteína astrocitária, indicando um estado de reatividade inflamatória (Liddel et al., 2017;

Escartin et al., 2021). Observamos aumento robusto da marcação para GFAP em CUP relativo ao CTL, indicando que a intoxicação por Cuprizona de fato induziu reatividade astrocitária. Tal resultado é corroborado por outros estudos em diferentes regiões do cérebro, como corpo caloso (Kim et al., 2017) e córtex motor (Nystad et al., 2020). Nosso grupo também já havia demonstrado aumento do GFAP com a Cuprizona em via visual subcortical (Araújo et al., 2017) e no córtex visual (Espírito-Santo et al., 2021), em camundongos C57BL/6. No entanto, o mesmo ainda não havia sido mostrado para camundongos suíços. Mostramos também que o Fingolimode manteve os níveis de GFAP do CUP. Este resultado indica que o Fingolimode não reduz a reatividade astrocitária no córtex visual de camundongos suíços intoxicados por Cuprizona. O Fingolimode foi capaz de reduzir níveis de GFAP em modelo de Cuprizona em camundongo C57BL/6 no corpo caloso (Kim et al., 2017). Enquanto não foi capaz de reduzir a reatividade astrocitária no processo de remielinização no corpo caloso e no córtex somatossensorial (Slowik et al., 2014). Outros dois estudos também não apresentaram redução de GFAP com a presença do Fingolimode no cerebelo (Alme et al., 2015), ou no corpo caloso e córtex motor (Nystad et al., 2020). Comparando com tais estudos, nosso trabalho foi o único que realizou tal análise no córtex visual e em camundongos suíços. E as divergências entre os resultados também poderiam ser devido a linhagens e regiões diferentes.

A fim de contribuir para a caracterização dos astrócitos do córtex visual no modelo de cuprizona, investigamos a presença de LAMP1 em astrócitos com o intuito de inferir acerca da atividade fagocítica astrocitária. Sabe-se que LAMP1 está relacionada com a produção e maturação de lisossomos tanto no processo de autofagia, quanto de fagocitose (Eskelinen, 2006; Binker et al., 2007; Saftig et al., 2008; Alessandrini et al., 2017). Apesar de a autofagia astrocitária já ser conhecida em modelos de doenças neurodegenerativas, como doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Misrielal et al., 2020; Sung e Jimenez-Sanchez, 2020; Wang e Xu, 2020), o mesmo não foi observado em EM, ou em seus modelos experimentais até o momento. Por outro lado, o aumento da fagocitose astrocitária já foi demonstrado em cérebros *post mortem* de pacientes com EM e em astrócitos em cultura submetidos à debris de mielina. Nos dois casos, foi observado aumento de LAMP1 astrocitário e a presença de proteínas de mielina no interior destes astrócitos (Ponath et al., 2017). Proteínas astrocitárias associadas à fagocitose ainda não foram estudadas em modelo de Cuprizona, portanto, a avaliação de LAMP1 no

nosso estudo pode contribuir para a compreensão do papel dos astrócitos na fagocitose tecidual no modelo. Neste sentido, notamos aumento significativo da marcação para LAMP1 no CUP em relação ao CTL na camada IV do córtex visual, indicando que a Cuprizona possivelmente aumenta a atividade fagocítica no tecido. E, pela primeira vez, nosso estudo mostrou que o Fingolimode parece não influenciar este aspecto, apesar de que o fármaco foi capaz de reverter alterações nos níveis da proteína em um estudo em modelo de mucopolidose IV (Weinstock et al., 2018). O aumento de LAMP1 no nosso modelo é corroborado pelos resultados de Beckmann e colaboradores, apesar de eles terem demonstrado aumento de LAMP1 no corpo caloso de camundongos C57BL/6 (Beckmann et al., 2023). Portanto, nossos resultados para LAMP1 contribuem para a compreensão da influência do Fingolimode sobre os níveis da proteína no córtex visual de camundongos tratados com Cuprizona, mesmo que não tenha ocorrido variação.

Em relação à expressão de LAMP1 por astrócitos, nosso resultado demonstra nítido aumento do LAMP1 astrocitário tanto em CUP quanto em FING em relação ao CTL. Este resultado sugere que a intoxicação por Cuprizona pode estar relacionada com aumento da atividade fagocítica em astrócitos no córtex visual de camundongos suíços, enquanto o Fingolimode não é capaz de atenuar. A contribuição de astrócitos na fagocitose em modelo de Cuprizona tem sido compreendida como ação indireta, induzindo resposta fagocítica em microglia (Sen et al., 2022). No entanto, o aumento de LAMP1 astrocitário em nosso estudo sugere que os astrócitos poderiam também ter ação direta na fagocitose tecidual. Dessa forma, seria interessante avaliar que tipo de carga estaria associada aos lisossomos astrocitários. Marcações triplas para GFAP, LAMP1 e, por exemplo, MBP poderiam revelar aspectos relevantes sobre a fagocitose astrocitária de mielina.

As consequências inflamatórias da produção da proteína do complemento C3 podem variar a depender de qual subunidade (C3a ou C3b) se encontra mais aumentada em determinada condição. A C3a normalmente atua na quimiotaxia e ativação de células da imunidade inata, enquanto a C3b atua na opsonização de antígenos para fagocitose. Independente disso, o aumento de C3 total normalmente está associado a condições inflamatórias (Delanghe et al., 2014). De maior relevância para o presente trabalho, um estudo genômico e proteômico acerca de astrócitos reativos demonstrou que um dos principais marcadores aumentados em astrócitos neurotóxicos é a proteína C3 (Liddel et al., 2017). Sendo assim,

avaliamos a expressão de C3 astrocitária no modelo de EM e após Fingolimode. Vale mencionar que não houve variação entre os níveis totais de C3 entre os grupos, indicando que tal fator não é influenciado pela intoxicação por Cuprizona ou pela ação do Fingolimode. Uma avaliação acerca das subunidades talvez resultaria em diferenças entre os grupos, uma vez que o aumento da fagocitose característica do modelo de Cuprizona poderia se relacionar com o aumento da subunidade C3b. Já a análise da co-localização com GFAP mostra que o C3 astrocitário aumenta em CUP em relação ao CTL, demonstrando que a Cuprizona de fato induz fenótipo pró-inflamatório astrocitário. O aumento do C3 astrocitário também foi demonstrado em corpo caloso de camundongos C57BL/6 tratados com Cuprizona por 12 semanas, em um modelo de desmielinização inflamatória crônica (Barati et al., 2022). Já o Fingolimode parece não modular este fator astrocitário em nosso modelo, uma vez que os níveis de C3 astrocitário não variaram entre FING e CUP. Assim, revelamos aqui, de modo inédito, que o Fingolimode não afeta a expressão astrocitária do fator associado ao fenótipo neurotóxico, C3.

A enzima Arg1 é muito importante para a regulação da produção excessiva de NO em contextos inflamatórios, como os da EM (Correale, 2021; Ivan et al., 2021). Apesar da ação da Arg1 ser mais descrita em macrófagos na EM (Ivan et al., 2021), a literatura recente mostra que a Arg1 astrocitária também é importante na atenuação de danos teciduais induzidos por NO e pode ser considerada como marcador de astrócitos anti-inflamatórios (Neal et al., 2018). Nosso resultado de imunofluorescência para Arg1 mostra que os níveis totais da proteína no córtex visual não variam entre os grupos. Noorzehi e colaboradores (2018) demonstraram aumento da Arg1 no corpo caloso de camundongos C57BL/6 intoxicados com Cuprizona. Pode ser que a modulação da expressão de Arg1 também varie entre as diferentes regiões cerebrais, assim como entre diferentes linhagens murinas. O Fingolimode também aparenta não modular os níveis de Arg1 no córtex visual em nosso modelo. Por outro lado, em modelo de EAE, modelo de EM que depende da imunidade periférica (Zha et al., 2021), foi mostrada modulação positiva de Arg1 mediada pelo Fingolimode. Porém, o presente estudo foi o primeiro a avaliar a modulação de Arg1 pelo Fingolimode em modelo de Cuprizona.

O BDNF é uma proteína da família das neurotrofinas, sendo a principal neurotrofina no cérebro adulto (Sasi et al., 2017). Em condições homeostáticas a proteína é secretada majoritariamente por neurônios, mas astrócitos são importante

fonte de BDNF, sobretudo em condições inflamatórias (Stadelmann et al., 2002; Fulmer et al., 2014; Sasi et al., 2017; Araki et al., 2020). BDNF é conhecido por promover proliferação neuronal, estruturar e estabilizar sinapses durante o desenvolvimento (Park e Poo, 2013; Sasi et al., 2017) e por promover sobrevivência neuronal e induzir regeneração axonal frente a danos (Sasi et al., 2017). Além disso, a sobrevivência, maturação e mielinização em oligodendrócitos também é mediada por BDNF. A indução do aumento de BDNF em modelo de Cuprizona já foi demonstrada como redutora de desmielinização (Fulmer et al., 2014).

Avaliando os níveis de BDNF no córtex visual em nosso estudo, observamos aumento significativo da neurotrofina induzido pela Cuprizona. Em lesões desmielinizantes de EM também já foi mostrado aumento de BDNF (Stadelmann et al., 2002). No entanto, estudos em modelo de Cuprizona demonstram resultados conflitantes. Enquanto He e colaboradores (2021) mostram que os níveis de BDNF não variam com a Cuprizona no corpo caloso de camundongos C57BL/6, no corpo caloso de camundongos 129/BALBC/C57 a Cuprizona reduziu os níveis da proteína (Fulmer et al., 2014). Pode ser que tais divergências possam ser justificadas pela diferença entre as linhagens de camundongos utilizadas, além da diferença entre regiões analisadas, uma vez que investigamos em região cortical e não no corpo caloso, como os autores citados.

Em nosso estudo observamos que o grupo FING manteve os níveis de BDNF elevados como o do CUP. Não encontramos na literatura estudos que avaliaram a ação do Fingolimode sobre a produção ou secreção de BDNF em pacientes com EM, nem em modelo de Cuprizona. Em modelo de EAE, o Fingolimode foi capaz de aumentar o BDNF no cerebelo, mesencéfalo e prosencéfalo (Smith et al., 2018). Considerando que o modelo de EAE conta com células inflamatórias periféricas atuando (alvos da ação do Fingolimode) no SNC e que tais células também são importantes fontes de BDNF no cérebro de pacientes com EM (Stadelmann et al., 2002), pode ser que, em EAE, a modulação farmacológica de BDNF seja mais sensível. Quando analisada a co-localização entre BDNF e GFAP, notamos aumento significativo do BDNF astrocitário em CUP relativo ao CTL. Em lesões desmielinizantes na EM, células inflamatórias, incluindo astrócitos, passam a ser as principais fontes de BDNF no cérebro (Stadelmann et al., 2002). Fulmer e colaboradores (2014) demonstraram em seu estudo que, apesar da diminuição de BDNF total observada com a Cuprizona, nas lesões desmielinizantes os astrócitos

se mostram como principais fontes de BDNF. Pode ser que o aumento de BDNF astrocitário seja uma forma de controlar danos teciduais e morte celular mediante a desmielinização inflamatória da Cuprizona. Por outro lado, notamos que o Fingolimode aumentou ainda mais o BDNF astrocitário, podendo indicar uma modulação neuroprotetora astrocitária. Vale ressaltar diferenças morfológicas no padrão de marcação entre CUP e FING. Apesar de a marcação de BDNF coincidir com vários astrócitos em CUP, marcações morfológicamente similares ao corpo celular de neurônios se encontram muito pronunciadas no grupo. O que não é observado em FING. Até onde se sabe, não existem diferenças funcionais entre o BDNF secretado por astrócitos ou por neurônios. O que se sabe é que o BDNF pode ser secretado em duas principais isoformas: a forma madura, simplesmente denominada BDNF, que atua sob o receptor de tirosina quinase B (trkB), pelo qual exerce as funções neuroprotetoras descritas; e a forma precursora da proteína denominada proBDNF, que atua sobre o receptor inespecífico de neurotrofinas p75, cujos resultados são relacionados com inflamação, morte celular e enfraquecimento sináptico (Stadelmann et al., 2002; Sasi et al., 2017; Araki et al., 2020). Neurônios podem secretar tanto proBDNF quanto BDNF maduro gerando sinalizações autócrinas e parácrinas com resultados distintos (Sasi et al., 2017). Enquanto que astrócitos exercem importante papel em recaptar proBDNF, reciclá-lo em BDNF e liberar a forma madura no microambiente (Sasi et al., 2017; Araki et al., 2020). De qualquer forma, qualquer afirmação acerca de diferenças funcionais de BDNF entre os nossos grupos experimentais necessitaria de confirmação experimental por análises específicas das isoformas prevalentes em cada grupo, além de realizar análises de efeito, como, por exemplo avaliar taxa de sobrevivência neuronal e oligodendrocítica. Associando os resultados para BDNF e MBP, notamos que, no nosso caso, o aumento de BDNF total e astrocitário induzidos por Fingolimode não acompanhou a reversão da desmielinização. Considerando que em modelo de EAE o aumento de BDNF, sobretudo astrocitário, se mostrou imprescindível para a atenuação da desmielinização (Fulmer et al., 2014), pode ser que, no nosso caso, este efeito atenuante poderia ocorrer posteriormente, talvez auxiliando no processo de remielinização. Uma abordagem razoavelmente simples para avaliar esta hipótese seria investigar a mielinização em animais tratados por 5 semanas com a Cuprizona, porém interrompendo a intoxicação e fazendo as análises uma semana após a remoção da droga. Desta forma, poderíamos avaliar se o BDNF astrocitário

aumentado pelo Fingolimode estaria potencializando o processo natural de remielinização.

## **6 - Conclusão**

Estudos que avaliam os efeitos de fármacos sobre os astrócitos em modelos de doenças neurológicas cada vez se tornam mais relevantes para a compreensão fisiopatológica e aprimoramentos terapêuticos. No caso de uma doença tão complexa quanto a EM, cujos tratamentos vigentes causam imunossupressão, a busca por mecanismos terapêuticos mais locais e menos sistêmicos, se faz ainda mais necessária. Utilizando um modelo de EM conhecido pela participação especial das células centrais do SNC, acreditamos que nossos resultados possam auxiliar na compreensão de como um fármaco considerado imunossupressor também pode modular a ação astrocitária. Neste sentido, nossos resultados sugerem que, apesar de aspectos inflamatórios astrocitários não terem sido tão influenciados pelo Fingolimode, funções neuroprotetores podem ter sido estimuladas.

Em nosso estudo, mostramos que o Fingolimode não foi capaz de reverter a perda de MBP induzida por Cuprizona, o aumento da proteína lisossômica LAMP1, ou de influenciar níveis de marcadores pró e anti-inflamatórios, como C3 e Arg1, respectivamente no córtex visual. Quando analisados tais fatores associados à astrócitos, aparentemente o fármaco também não é capaz de alterá-los, assim como não foi capaz de diminuir a reatividade astrocitária, evidenciada pela expressão de GFAP. Considerando que em outros estudos que utilizaram protocolos diferentes, linhagens de animais diferentes e, sobretudo, investigaram regiões anatômicas diferentes, pode ser que a divergência com parte destes estudos se justifique nestes fatos. De fato, a intensidade, temporalidade e distribuição anatômica de eventos característicos do modelo de Cuprizona são variáveis de acordo com a linhagem murina, os protocolos de administração da droga e, particularmente, a região anatômica estudada (Skripuletz et al., 2008; Vega-Riquer et al., 2019). Sendo assim, pode ser que o Fingolimode, ao menos para os aspectos avaliados por nós, também atue em uma dinâmica diferente, se investigado especificamente em córtex visual de camundongos suíços. Como a grande maioria dos estudos em modelos de EM se dão em regiões de substância branca e em camundongos C57BL/6, nosso trabalho pode ser útil para a melhor compreensão do modelo de Cuprizona em camundongos suíços e em região cortical, especialmente relacionada à via visual que é tão

acometida em pacientes de EM (Graham e Klistorner, 2016; Cooray et al., 2019). Além de apresentar resultados novos acerca do Fingolimode no modelo.

Por mais que o Fingolimode não tenha sido capaz de modular aspectos inflamatórios astrocitários, o aumento de BDNF nestas células pode indicar uma indução de ação neuroprotetora pelo fármaco. O aumento de BDNF astrocitário induzido por fármacos é algo frequentemente associado com aumento de sobrevivência neuronal e oligodendrocítica em doenças neurológicas, como a EM, ou em seus modelos experimentais (Stadelmann et al., 2002; Fulmer et al., 2014; Smith et al., 2018; Araki et al., 2020; He et al., 2021). Pode ser que o aumento do BDNF astrocitário em nosso estudo se relacione com o aumento da sobrevivência neuronal, ou, até mesmo, com uma potencialização da remielinização em contexto de remissão. A despeito destas hipóteses, acreditamos que nosso trabalho contribui para a elucidação de como o Fingolimode pode modular funções astrocitárias no córtex visual de camundongos suíços em modelo de Cuprizona.

## 7 - Referências Bibliográficas

- ADACHI, K. et al. **Design, synthesis, and structure-activity relationship of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: Discovery of a novel immunosuppressant, FTY720.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 5, n. 8, p. 853–856, 1995.
- ALESSANDRINI, F. **LAMPs: Shedding Light on Cancer Biology.** Seminars in Oncology, 2017.
- ALME, M. et al. **Fingolimod Does Not Enhance Cerebellar Remyelination In The Cuprizone Model.** Journal Of Neuroimmunology, v. 285, p. 180-186, 2015.
- ARAKI, T. et al. **The effects of microglia- and astrocyte-derived factors on neurogenesis on health and disease.** European Journal Of Neuroscience, v. 54, p. 5880-5901, 2021.
- ARAÚJO, S. et al. **Inflammatory Demyelination Alters Subcortical Visual Circuits.** Journal Of Neuroinflammation, v. 14, n. 162, 2017.
- BARATI, S. et al. **The effects of mesenchymal stem cells transplantation on A1 neurotoxic reactive astrocyte and demyelination in the cuprizone model.** Journal of Molecular Histology, v. 53, p. 333-346, 2022.
- BECKMANN, N. et al. **Genetic models of cleavage-reduced and soluble TREM2 reveal distinct effects on myelination and microglia function in the cuprizone model.** Journal of Neuroinflammation, v. 20, n. 29, p. 1-22, 2023.
- BINKER, M. G. et al. **Arrested maturation of Neisseria-containing phagosomes in the absence of the lysosome-associated membrane proteins, LAMP-1 and LAMP-2.** Cellular Microbiology, v. 9, p. 2153-2166, 2007.
- BRINKMANN, V. et al. **FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression.** Transplant. Proc. 33, 530–531, 2001.

- 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.
- BROWNELL, B.; HUGHES, J. T. **The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis**. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, v. 25, p. 315–320, 1962.
- CARTIER, A; HLA, T. **Sphingosine 1-Phosphate: Lipid Signaling In Pathology And Therapy**. *Science*, v. 366, n. 323, p. 1-12, 2019.
- CHIBA, K. et al. **FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing**. *J. Immunol.* 160, 5037–5044, 1998.
- CHOI, J. W. et al. **FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 2, p. 751–756, 2011.
- CHU, F. et al. **The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis**. *Journal of Neuroimmunology*, v. 318, n. December 2017, p. 1–7, 2018.
- COHEN, J. A. et al. **Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis**. *New England Journal of Medicine*, v. 362, n. 5, p. 402–415, 2010.
- COLOMBO, E. et al. **Fingolimod May Support Neuroprotection Via Blockade Of Astrocytes Nitric Oxide**. *ANN Neurol*, v. 76, p. 325-337, 2014.
- COOREY, G; SUNDGREN, M; BRISMAR, T. **Mechanisms Of Visual Network Dysfunction In Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis And Its Relation To Cognition**. *Journal Pre-Proofs*, 2019.
- CORREALE, J. **Immunosuppressive Amino-acid Catabolizing Enzymes in Multiple Sclerosis**. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. 600428, p. 1-9, 2021.
- CUI, L. et al. **The roles of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis**. *International Immunopharmacology*, v. 83, p. 1-11, 2020.
- DELANGHE, J. R. et al. **Complement C3 and its polymorphism: biological and clinical consequences**. *Pathology*, v. 46, p. 1-10, 2014.
- DENDROU, C. A.; FUGGER, L.; FRIESE, M. A. **Immunopathology of multiple sclerosis**. *Nature Reviews Immunology*, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.
- DOOLEN, S. et al. **Fingolimod Reduces Neuropathic Pain Behaviors in a Mouse Model of Multiple Sclerosis by a Sphingosine-1 Phosphate Receptor 1-Dependent Inhibition of Central Sensitization in the Dorsal Horn**. *Pain*, v. 159, n. 2, p. 224-238, 2018.
- ESCARTIN, C. **Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions**. *Nature Neuroscience*, v. 24, p. 312-325, 2021.
- ESKELINEN, E. **Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy**. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 27, p. 495-502, 2006.
- ESPÍRITO-SANTO, S. et al. **Astrocytes as a target for Nogo-A and implications in vitro and in a model of acute demyelination**. *Glia*, v. 69, p. 1429-1443, 2021.
- FAREZ, M; CORREALE, J. **Sphingosine 1-phosphate Signaling In Astrocytes: Implication For Progressive Multiple Sclerosis**. *Journal Of The Neurological Sciences*, v. 361, p. 60-65, 2016.

- FULMER, C. G. **Astrocyte-Derived BDNF Supports Myelin Protein Synthesis after Cuprizone-Induced Demyelination.** *The Journal of Neuroscience*, v. 34, n. 24, p. 8186 – 8196, 2014.
- GIOVANNONI, G. et al. **Brain health: time matters in multiple sclerosis.** *Multiple Sclerosis And Related Disorders*, v. 9, p. S5-S48, 2016.
- GRAHAM, S; KLISTONER, A. **Afferent Visual Pathways In Multiple Sclerosis: A Review.** *Clinical & Experimental Ophthalmology*, p. 1-11, 2016.
- HAUSER, S. L. et al. **Treatment of Multiple Sclerosis: A Review.** *American Journal of Medicine*, v. 133, n. 12, p. 1-20, 2020.
- HE, Y. et al. **Ethyl Pyruvate–Derived Transdifferentiation of Astrocytes to Oligodendrogenesis in Cuprizone-Induced Demyelinating Model.** *Neurotherapeutics*, v. 18, p. 488-502, 2021.
- HUISKAMP, M. et al. **Inhibitory synaptic loss drives network changes in multiple sclerosis: An ex vivo to in silico translational study.** *Multiple Sclerosis Journal*, v. 28, p. 2010-2019, 2022.
- IVAN, D. C. et al. **Central Nervous System Barriers Impact Distribution and Expression of iNOS and Arginase-1 in Infiltrating Macrophages During Neuroinflammation.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. 666961, p. 1-19, 2021.
- KAMMA, E. et al. **Central nervous system macrophages in progressive multiple sclerosis: relationship to neurodegeneration and therapeutics.** *Journal of Neuroinflammation*, p. 1-27, 2022.
- KIM, S. et al. **Functional Antagonism Of Sphingosine-1-phosphate Receptor 1 Prevents Cuprizone-induced Demyelination.** *Glia*, p. 1-16, 2017.
- KLEIJN, K; MARTENS, G. **Molecular Effects Of FDA-Approved Multiple Sclerosis Drugs On Glial Cells And Neurons Of The Central Nervous System.** *International Journal Of Molecular Sciences*, v. 21, n. 4229, p. 1-49, 2020.
- KUNKL, M. et al. **T Helper Cells: The Modulators Of Inflammation in Multiple Sclerosis.** *Cells*, v. 9, n. 2, p. 482, 2020.
- KWON, H; KOH, S. **Neuroinflammation In Neurodegenerative Disorders: The roles of microglia and astrocytes.** *Translational Neurodegeneration*, v. 9, n. 42, p. 1-12, 2020.
- LASSMANN, H. **Multiple sclerosis pathology.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 8, n. 3, p. 1–16, 2018.
- LAZO-GOMEZ, R. et al. **Mechanisms of neurobehavioral abnormalities in multiple sclerosis: Contributions from neural and immune components.** *Clinical Neurophysiology Practice*, v. 4, p. 39–46, 2019.
- LIDDELOW, S. A.; BARRES, B. A. **Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential.** *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 957–967, 2017.
- LIDDELOW, S. A. et al. **Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia.** *Nature*, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.
- LUCAS, R. M. et al. **Epstein-Barrvirus and multiple sclerosis.** *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v. 82, n. 10, p. 1142–1148, 2011.
- MANDOLESI, G. et al. **Synaptopathy connects inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis.** *Nature Reviews Neurology*, p. 1-14, 2015.
- MISRIELAL, C. et al. **Autophagy in Multiple Sclerosis: Two Sides of the Same Coin.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 14, n. 603710, p. 1-15, 2020.
- MITRA, N. K. **Locomotor and histological changes in a cuprizone-induced animal model of multiple sclerosis: comparison between alpha-tocopherol**

- and fingolimod.** Research in Pharmaceutical Sciences, v. 17, n. 2, p. 134-142, 2022.
- MOCK, E. E. A. et al. **Synaptic Loss In Multiple Sclerosis: A Systematic Review Of Human Post-mortem Studies.** Frontiers in Neurology, v. 12, n. 782599, p. 1-12, 2021.
- NEAL, M. et al. **Prokineticin-2 promotes chemotaxis and alternative A2 reactivity of astrocytes.** Glia, p. 1-21, 2018.
- NOORZEHI, G. et al. **Microglia polarization by methylprednisolone acetate accelerates cuprizone induced demyelination.** Journal of Molecular Histology, v. 49, p. 471-479, 2018.
- NYSTAD, A. E. et al. **Fingolimod downregulates brain sphingosine-1-phosphate receptor 1 levels but does not promote remyelination or neuroprotection in the cuprizone model.** Journal of Neuroimmunology, v. 339, p. 1-11, 2020.
- OHLMEIER, C. et al. **Epidemiology, characteristics and treatment of patients with relapsing remitting multiple sclerosis and incidence of high disease activity: Real world evidence based on German claims data.** Plos One, p. 1-14, 2020.
- OLCUM, M. et al. **Microglial NLRP3 inflammasome activation in multiple sclerosis.** Advances in Protein Chemistry and Structural Biology, v. 119, p. 1-62, 2019.
- PALUMBO, S; PELLEGRINI, S. **Experimental In Vivo Models of Multiple Sclerosis: State of the Art.** In: Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis, capítulo 11, p. 173-183, 2017.
- PARK, H; POO, M. **Neurotrophin regulation of neural circuit development and function.** Nature Reviews Neuroscience, v. 14, p. 7-23, 2013.
- PARNELL, G. P.; BOOTH, D. R. **The Multiple Sclerosis (MS) Genetic Risk Factors Indicate Both Acquired And Innate Immune Cell Subsets Contribute to MS Pathogenesis And Identify Novel Therapeutic Opportunities.** Frontiers in Immunology, v. 8, n. 425, p. 1-6, 2017.
- PONATH, G. et al. **Myelin phagocytosis by astrocytes after myelin damage promotes lesion pathology.** Brain, v. 140, p. 399-413, 2017.
- PONATH, G. et al. **The Role of Astrocytes In Multiple Sclerosis.** Frontiers in Immunology, v. 9, n. 217, p. 1-12, 2018.
- PURVES, D. et al. **Neurociências.** 4ª Edição, Tradução Artmed, 2010.
- ROBINSON, A. P. et al. **The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment.** Handbook of Clinical Neurology, v. 122, p. 173-189, 2014.
- SAFTIG, P. et al. **LAMP-2: A control step for phagosome and autophagosome maturation.** Autophagy, v. 4, p. 510-512, 2008.
- SASI, M. **Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling.** European Journal of Physiology, 2017.
- SEN, M. K. et al. **Behavioural phenotypes in the cuprizone model of central nervous system demyelination.** Neurosciences and BioBehavioural Reviews, v. 107, p. 23-46, 2019.
- 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, p. 1215-1250, 2022.
- SHANG, K. et al. **Fingolimod promotes angiogenesis and attenuates ischemic brain damage via modulating microglial polarization.** Brain Research, v. 1726, p. 1-8, 2020.

- SKRIPULETZ, T. et al. **Cortical Demyelination Is Prominent in the Murine Cuprizone Model and Is Strain-Dependent.** The American Journal of Pathology, v. 172, n. 4, p. 1053-1061, 2008.
- SKRIPULETZ, T. et al. **De- and remyelination in the CNS white and grey matter induced by cuprizone: The old, the new, and the unexpected.** Cellular and Histology And Histopathology, v. 26, p. 1585-1597, 2011.
- SLOWIK, A. et al. **The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 is neuroprotective after cuprizone-induced CNS demyelination.** British Journal of Pharmacology, v. 172, p. 80-92, 2014.
- SMITH, P. A. et al. **Fingolimod inhibits brain atrophy and promotes brain-derived neurotrophic factor in an animal model of multiple sclerosis.** Neuroimmunology, 2018.
- STADELMANN, C. et al. **Striatal astrocytes engulf dopaminergic debris in Parkinson's disease: A study in an animal model.** Brain, v. 125, p. 75-85, 2002.
- SUNG, K; JIMENEZ-SANCHEZ, M. **Autophagy in Astrocytes and its Implications in Neurodegeneration.** Journal of Molecular Biology, v. 432, p. 2605-2621, 2020.
- VEGA-RICQUER, J. M. et al. **Five Decades of Cuprizone, an Updated Model to Replicate Demyelinating Diseases.** Current Neuropharmacology, v. 17, p. 129-141, 2019.
- VOET, S. et al. **Microglia in Central Nervous System Inflammation and Multiple Sclerosis Pathology.** Trends in Molecular Medicine, v. 25, p. 112-123, 2019.
- WANG, J; XU, C. **Astrocytes autophagy in aging and neurodegenerative disorders.** Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 122, p. 1-13, 2019.
- WEINSTOCK, L. D. et al. **Fingolimod phosphate inhibits astrocyte inflammatory activity in mucopolidosis IV.** Human Molecular Genetics, v. 27, n. 15, p. 2725-2738, 2018.
- Yi, W. et al. **Astrocytes in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: Star-shaped cells illuminating the darkness of CNS autoimmunity.** Brain, Behavior and Immunity, v. 80, p. 10-24, 2019.
- YOGEV, N. et al. **Dendritic Cells Ameliorate Autoimmunity in the CNS by Controlling the Homeostasis of PD-1 Receptor+ Regulatory T Cells.** Immunity, v. 37, p. 264-275, 2012.
- ZHA, Z. et al. **Bu Shen Yi Sui Capsule Alleviates Neuroinflammation and Demyelination by Promoting Microglia toward M2 Polarization, Which Correlates with Changes in miR-124 and miR-155 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity, p. 1-26, 2021.
- ZHANG, Z. et al. **The Appropriate Marker for Astrocytes: Comparing the Distribution and Expression of Three Astrocytic Markers in Different Mouse Cerebral Regions.** BioMed Research International, p. 1-15, 2019.
- ZISER, L. et al. **Utility of gradient recalled echo magnetic resonance imaging for the study of myelination in cuprizone mice treated with fingolimod.** NMR In Biomedicine, p. 1-13, 2017.