

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

Melissa Teixeira Goulart

**O TRATAMENTO COM VU0409551, UM MODULADOR ALOSTÉRICO POSITIVO
DO mGluR5, MELHORA SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E
MOLECULARES EM UM MODELO MURINO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Belo Horizonte
2025

Melissa Teixeira Goulart

**O TRATAMENTO COM VU0409551, UM MODULADOR ALOSTÉRICO POSITIVO
DO mGluR5, MELHORA SINAIS CLÍNICOS, PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E
MOLECULARES EM UM MODELO MURINO DA ESCLEROSE MÚLTIPLA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Imunologia da Universidade
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutora em Bioquímica e
Imunologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabíola Mara Ribeiro

Belo Horizonte

2025

043

Goulart, Melissa Teixeira.

O tratamento com VU0409551, um modulador alostérico positivo do mGluR5, melhora sinais clínicos, parâmetros imunológicos e moleculares em um modelo murino da esclerose múltipla [manuscrito] / Melissa Teixeira Goulart. – 2025.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Mara Ribeiro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Esclerose Múltipla. 3. Encefalomielite Autoimune Experimental. 4. Receptor de Glutamato Metabotrópico 5. I. Ribeiro, Fabíola Mara. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MELISSA TEIXEIRA GOULART.
Aos dezesseis dias do mês de julho de 2025 às 08:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "O tratamento com VU0409551, um modulador alostérico positivo do mGluR5, melhora sinais clínicos, parâmetros imunológicos e moleculares em um modelo murino da Esclerose Múltipla", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof^a. Fabíola Mara Ribeiro, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Tatiani Uceli Maioli (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Antônio Lúcio Teixeira Junior (University of Texas Health Science Center), aprovada; Dr. Rafael Machado Rezende (Harvard Medical School), aprovada; Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

(x) APROVADA
() REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de julho de 2025.

Dra. Grace Schenatto Pereira Moraes (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br GRACE SCHENATTO PEREIRA MORAES
Data: 23/07/2025 16:14:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Tatiani Uceli Maioli (UFMG)

Documento assinado digitalmente
gov.br TATIANI UCELI MAIOLI
Data: 26/07/2025 16:18:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Antônio Lúcio Teixeira Junior (University of Texas Health Science Center)

Antonio L. Teixeira

Dr. Rafael Machado Rezende (Harvard Medical School)

Documento assinado digitalmente
gov.br RAFAEL MACHADO REZENDE
Data: 31/07/2025 09:58:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Fabíola Mara Ribeiro - Orientadora (UFMG)

gov.br FABIOLA MARA RIBEIRO
Data: 16/07/2025 16:34:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

À memória de meu pai, Helder, por ter sido
fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à professora Dra. Fabíola Ribeiro pela orientação e acompanhamento durante todos esses anos. Agradeço pelos conhecimentos compartilhados e pelas oportunidades. Pelas infinitas vezes que esteve presente, seja na análise dos dados ou nos próprios experimentos. Agradeço pelos momentos em que foi compreensiva e atenciosa quando passei por situações delicadas. Sem seu auxílio essa caminhada seria impossível!

Agradeço a meu pai, Helder Moraes Goulart, “com T mudo”. Por ser minha maior fonte de inspiração para trilhar o caminho científico, mesmo sem entender o que isso significava. Sou imensamente grata por ter vivido 29 anos ao lado de um ser que irradiava alegria e uma resiliência memorável. Sua trajetória vivendo com a Esclerose Múltipla me proporcionou uma visão mais humana e empática e me fez querer contribuir de alguma forma. Essa foi a forma que encontrei. Sempre foi por você, Pai.

Ao meu marido, João Pedro, por todo apoio e companheirismo durante este período. Por ter sido compreensivo e um ombro nos momentos difíceis. Agradeço, ainda, pelas infinitas contribuições científicas a este trabalho. Viver a vida com você é um presente! Eu te amo infinitamente!

Agradeço aos amigos que ajudaram imensamente na execução deste trabalho: Julia Fahel, Esther Marques, Pablo Cardozo, Nathália Costa, Juliana Fantin e Juliana Brandi.

Aos membros atuais e passados do laboratório Neurobioquímica que contribuíram indireta ou diretamente para a execução deste trabalho.

À minha grande amiga Juliana Brandi, por se fazer presente em todos os momentos dessa caminhada. E, mais do que isso, ser suporte, apoio, companheirismo e muita diversão. Muito obrigada!

Às minhas queridas amigas: Izabella Quirino, Esther Marques e Nathália Costa, por todos os momentos de auxílio e distrações. Por deixarem esse processo mais leve apenas por vocês existirem na minha vida.

Agradeço infinitamente a minha família, que é meu porto seguro. Minha mãe, Cida e minha irmã, Larissa. Por entenderem a ausência necessária em muitos momentos e por serem presentes mesmo à distância. Por me fazerem sentir que sempre tenho um lugar seguro pra voltar. Agradeço ao meu sobrinho, Otto, por ter chegado em um dos momentos mais difíceis da minha vida e me mostrado que a vida

ainda poderia ser boa. Agradeço à minha tia e segunda mãe, Jomara, por se fazer presente sempre e por ser uma grande amiga. Eu amo vocês demais!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho, seja atuando diretamente nos experimentos, análises de dados, ou sendo um ombro amigo e acolhedor.

Agradeço à banca examinadora pela disponibilidade de avaliar e contribuir com este trabalho.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença neurodegenerativa, autoimune, inflamatória e desmielinizante. É a principal doença incapacitante em adultos jovens e seus sintomas são variados e dependentes da região afetada no sistema nervoso central. As drogas modificadoras de doença que são utilizadas para tratar a EM frequentemente apresentam efeitos colaterais graves, são incapazes de curar e falham em conter a progressão independente de recaídas. O receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5) vem sendo apontado como alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do tratamento com VU0409551, um modulador alostérico positivo (MAP) de mGluR5, em parâmetros comportamentais de ansiedade e depressão, fisiopatológicos, imunológicos e moleculares no modelo EAE. A modulação alostérica positiva de mGluR5, através do tratamento com VU0409551 em animais EAE, foi capaz de: I) melhorar a pontuação clínica dos animais e prevenir a queda de peso natural do modelo; II) diminuir comportamentos semelhantes a ansiedade ao aumentar o número de entradas no campo claro no teste da caixa claro-escuro e aumentar o tempo no braço aberto e entradas no braço aberto no teste de labirinto em cruz elevado; III) modular a resposta imune periférica ao prevenir aumento de IL-17 e de células Th1 no baço; IV) regular negativamente vias relacionadas ao sistema imune que são reguladas positivamente quando a EAE é induzida; V) diminuir a expressão gênica de marcadores de oligodendrócitos associados a doença, como a *Serpina3n* e *H2D1*; VI) normalizar o aumento no número de astrócitos no córtex; VII) prevenir aumento de micróglia e influxo de monócitos no SNC. Esses dados reforçam o papel do mGluR5 como possível alvo terapêutico para doenças neuroinflamatórias e neurodegenerativas, já que o uso de um MAP de mGluR5, o VU0409551, apresenta efeitos protetores e imunomoduladores.

Palavras-chave: esclerose múltipla; EAE; mGluR5; VU0409551.

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a neurodegenerative, autoimmune, inflammatory, and demyelinating disease. It is the leading cause of disability in young adults, and its symptoms vary depending on the region of the central nervous system affected. Disease-modifying drugs used to treat MS often have serious side effects, are unable to cure the disease, and fail to halt its relapse-independent progression. The type 5 metabotropic glutamate receptor (mGluR5) has been identified as a potential therapeutic target for neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. Therefore, the aim of this study is to evaluate the effects of treatment with VU0409551, a positive allosteric modulator (PAM) of mGluR5, on behavioral parameters related to anxiety and depression, as well as pathophysiological, immunological and molecular parameters, in the EAE model. Positive allosteric modulation of mGluR5 through treatment with VU0409551 in EAE animals was able to: I) improve clinical score and prevent the model's characteristic weight loss; II) reduce anxiety-like behaviors by increasing the number of entries into the light area in the light-dark box test, and by increasing both time spent and entries in the open arm in the elevated plus maze test; III) modulate the peripheral immune response by preventing the increase of IL-17 and Th1 cells in the spleen; IV) downregulate immune-related pathways that are upregulated when EAE is induced; V) reduce the gene expression of disease-associated oligodendrocyte markers such as *Serpina3n* and *H2D1*; VI) normalize the increased number of astrocytes in the cortex; VII) prevent the increase of microglia and the influx of monocytes into the CNS. These findings reinforce the role of mGluR5 as a potential therapeutic target for neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, as the use of the mGluR5 PAM, VU0409551, demonstrates protective and immunomodulatory effects.

Keywords: multiple sclerosis; EAE; mGluR5; VU0409551.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Modelo para vias de sinalização do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5).....	27
Figura 2 – Modelo via de sinalização do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) quando estimulado pelo modulador alostérico positivo (MAP), VU0409551..	29
Figura 3 - Fórmula estrutural do MAP para mGluR5, VU0409551 (VU).....	36
Figura 4 – Estratégia de “gating” para selecionar células Th1 e Th17 em baço.....	42
Figura 5 - Estratégia de “gating” para selecionar micróglia e monócitos em tecido cerebral.	44
Figura 6 - Cronologia experimental da primeira etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.....	51
Figura 7 – O tratamento com VU0409551 diminuiu a pontuação clínica de animais EAE, mas este efeito não permaneceu após o término do tratamento.	52
Figura 8 - Cronologia experimental da segunda etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.....	53
Figura 9 - O tratamento com VU0409551, iniciando no dia 10 ou 14 dpi, não altera a pontuação clínica de animais EAE.....	54
Figura 10 - Cronologia experimental da terceira etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.....	55
Figura 11 – O tratamento com VU0409551 diminuiu a pontuação clínica de animais EAE e impediu a perda de peso destes animais.	56
Figura 12 - Esquema experimental de testes comportamentais e pontuação clínica.	58
Figura 13- Animais EAE, tratados ou não com VU0409551, apresentam locomoção reduzida na fase pré-clínica..	59
Figura 14 – O tratamento com VU0409551 não altera parâmetros locomotores e do tipo ansiosos em animais EAE na fase de remissão do modelo.	60
Figura 15 – Animais EAE não apresentam comportamentos semelhantes a depressão no teste de suspensão da cauda.....	61
Figura 16 – O tratamento com VU0409551 em animais EAE altera comportamentos de autocuidado de forma dependente da fase do modelo.	62

Figura 17 – O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade no teste Claro-escuro.....	64
Figura 18 – O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade no teste de Labirinto em Cruz Elevado.....	65
Figura 19 – O tratamento com VU0409551 reverte aumento de IL-17 e da subpopulação Th1 na periferia em animais EAE no pico do modelo (16 dpi)	67
Figura 20 – O uso da droga em animais sem condições patológicas não ocasiona em mudanças de perfil proteômico.	69
Figura 21 – O tratamento com VU0409551 regula negativamente proteínas do sistema imune em animais EAE no pico do modelo (16 dpi).....	70
Figura 22 – O tratamento com VU0409551 regula negativamente vias do sistema imune em animais EAE no pico do modelo (16 dpi).....	71
Figura 23 – O tratamento com VU0409551 em animais EAE reverte aumento de expressão gênica de TNF no córtex na fase de remissão do modelo (28 dpi).....	72
Figura 24 – A expressão gênica de marcadores inflamatórios e relacionados a mielinização não é alterada em nenhuma das condições avaliadas no período de remissão do modelo (28 dpi).....	73
Figura 25 – O tratamento com VU0409551 reverte aumento no número de astrócitos no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi).....	74
Figura 26 – O tratamento com VU0409551 reduz o aumento de expressão de mRNA de C3 no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi).	75
Figura 27 – A intensidade de fluorescência de MBP não é alterada no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi).	76
Figura 28 – O Tratamento com VU0409551 diminui marcadores de oligodendrócitos associados a doença no período em animais EAE, no período de remissão (28 dpi). (A-E) Análise de RT-qPCR no córtex cerebral:.....	77
Figura 29 – O tratamento com VU0409551 aumenta níveis de mRNA de B2M na medula no período de remissão (28 dpi).....	78
Figura 30 – No período de remissão (28 dpi), o número de micróglia no córtex é aumentado em animais EAE tratados apenas com Veículo, mas não em animais EAE tratados com VU0409551.....	79
Figura 31 – As micróglia do córtex não apresentam sinais de ativação celular no período de remissão (28 dpi) do modelo.....	80
Figura 32 – Quanto maior a pontuação clínica, maior o número de micróglia no período de remissão (28 dpi) do modelo EAE.....	82

Figura 33 – A morfologia de micróglia não é alterada no córtex no período de remissão (28 dpi) do modelo.....	84
Figura 34 – Quanto maior a pontuação clínica dos animais, menor é o comprimento médio dos ramos de micróglia, no córtex e no período de remissão (28 dpi) do modelo EAE.	85
Figura 35 – Micróglia TNF+ estão aumentadas no grupo EAE Veículo, mas não no grupo EAE VU.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escala de pontuação de acordo com características clínicas do modelo	35
Tabela 2 – Painel de anticorpos para marcação em citometria de fluxo em baço	42
Tabela 3 – Painel de anticorpos para marcação em citometria de fluxo de cérebro .	43
Tabela 4 – Sequência de iniciadores utilizados na técnica de RT-qPCR	47
Tabela 5 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo Controle VU e Controles Veículo	112
Tabela 6 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo EAE Veículo e Controles Veículo.....	112
Tabela 7 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo EAE VU e EAE Veículo	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Ammonium-chloride-potassium
ADS	Antibody dilution solution
ADEM	Encefalomielite disseminada aguda monofásica
AKT	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
B2M	Beta-2-microglobulina
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
BSA	Albumina de soro bovino
C3	Componente C3 do complemento
C4b	Componente C4b do complemento
CD3	Glicoproteína CD3
CD4	Glicoproteína CD4
CD11b	Integrina CD11b
CD45	Fosfatase CD45
CD68	Glicoproteína CD68
CDPPB de mGluR5	3-ciano-N-(1,3-difenil-1H-pirazol-5-il), modulador alostérico positivo
CEUA	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund
CHPG mGluR5	Cloridroxifenilglicina, 2-cloro-5-hidroxifenilglicina, agonista de
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao cAMP
CSF-1	Fator estimulador de colônia 1
CSF-1R	Receptor CSF-1
DAG	1,2-diacilglicerol
DAP	Proteínas diferencialmente abundantes
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DDA	Modo de aquisição dependente de dados
dpi	Dias pós imunização
EAE	Encefalomielite autoimune experimental
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente ligado à Enzima
EM	Esclerose Múltipla
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente progressiva
EMRR	Esclerose Múltipla Remitente-recorrente
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente progressiva
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2
FC	Fold-change
FoxP3	Fator de transcrição FoxP3
FSC	Parâmetro de tamanho
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos
GO	Gene Ontology
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
GSK-3 β	Glicogênio sintase quinase 3 beta
GSEA	Análise de enriquecimento de conjunto de genes
H2-D1	Antígeno de histocompatibilidade
Homer1	Proteína Homer 1

HPRT	Hipoxantina fosforibosiltransferase
Iba-1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1
IF	Imunofluorescência
IFN- β	Interferon-beta
IFN- γ	Interferon-gama
IGluR	Receptores ionotrópicos de glutamato
IHC	Imunohistoquímica
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-17	Interleucina-17
IP3	Inositol1,4,5-trifosfato
IP3R	Receptores intracelulares de IP3
I.P	Intraperitoneal
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
LM	Modelos de regressão lineares simples
Ly6C	Antígeno Ly6C
MAN	Modulação alostérica negativa
MAP	Modulação alostérica positiva
MBP	Proteína básica de mielina
MEK	Quinase regulada por sinal extracelular (MAP/ERK quinase)
mGluRs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOGAD	Doença associada a anticorpos da glicoproteína de oligodendrócitos
de mielina	
MOG35-55	Peptídeo de glicoproteína de oligodendrócito de mielina
MPEP	2-metil-6-(feniletinil)-piridina, antagonista de mGluR5
MTEP	(3-((2-Metil-4-tiazolil) etinil) piridina), antagonista de mGluR5
Mtor	Alvo mecanicista da rapamicina
NMDA	N-metil D-Aspartato
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPCs	Células progenitoras de oligodendrócitos
P2RY12	Receptor P2Y12
PBS	Tampão fosfato-salino
PC1	Primeiro componente principal
PC2	Segundo componente principal
PCA	Análise de Componentes Principais
PFA	Paraformaldeído
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIKE	Fosfatidilinositol 3-quinase enhancer
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PIRA	Progressão independente da atividade de recaída
PLC β 1	Fosfolipase C beta 1
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RAW	Piora associada à recaída
RE	Retículo endoplasmático
RPL32	Proteína ribossomal L32
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
RT-qPCR	RT-PCR quantitativo

S100 β	Proteína S100 beta
SEM	Erro padrão da média
Serpina3n	Inibidor de serina protease
SFB	Soro Fetal Bovino
SIP	Solução Isotônica de Percoll
SNC	Sistema nervoso central
SPS-RTS	Seleção síncrona de precursores e busca em tempo real
SSC	Granulosidade
T-bet	Fator de transcrição T-bet
TBS	Solução Salina Tamponada com Tris
TBST	TBS contendo Triton X-100
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th1	Células T helper 1
Th17	Células T helper 17
TMD	Terapias modificadoras de doença
TMT	Tandem Mass Tag
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
VU	VU0409551
VU0409551	Modulador alostérico positivo de mGluR5

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Esclerose múltipla: a principal causa de incapacidade não traumática em jovens adultos	19
1.1.1	Fisiopatologia: entendendo os mecanismos por trás da apresentação clínica	20
1.2	Encefalomielite autoimune experimental: o principal modelo por trás da base teórica e terapêutica da esclerose múltipla	22
1.3	Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5): modulando a neuroinflamação e neurodegeneração	24
1.3.1	Modulação alostérica positiva de mGluR5: emergindo um possível tratamento para doenças neurodegenerativas?	27
1.4	Terapias modificadoras de doença: um sucesso parcial	29
2	JUSTIFICATIVA.....	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo Geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	Animais	35
4.2	Modelo Murino de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) e tratamento.....	35
4.2.1	Primeira etapa de padronização.....	36
4.2.2	Segunda etapa de padronização.....	37
4.2.3	Terceira etapa de Padronização	37
4.3	Comportamentos.....	37
4.3.1	Campo aberto.....	37
4.3.2	Suspensão da cauda.....	38
4.3.3	<i>Splash and grooming</i>	38
4.3.4	Caixa claro-escuro.....	39
4.3.5	Labirinto em cruz elevado	39
4.4	Cultura de esplenócitos.....	39

4.4.1	Dosagem de citocinas	40
4.4.2	Estímulo da cultura de esplenócitos	40
4.5	Citometria de Fluxo	41
4.6	Proteômica – LC- MS/MS	44
4.7	RT-PCR quantitativo (RT-qPCR).....	46
4.8	Imunomarcação	47
4.8.1	Marcação de astrócitos	47
4.8.2	Marcação de desmielinização	48
4.8.3	Marcação de micróglias.....	49
4.9	Análises estatísticas.....	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	O tratamento com VU0409551 diminui a pontuação clínica de fêmeas EAE 51	
5.1.1	Primeira etapa de padronização do modelo EAE e do tratamento com VU0409551	51
5.1.2	Segunda etapa de padronização.....	52
5.1.3	Terceira etapa de padronização	54
5.2	O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos do tipo ansioso e depressivo no modelo EAE.....	57
5.2.1	Animais EAE tem locomoção reduzida na fase pré-clínica	58
5.2.2	O uso de VU0409551 em animais EAE pode ter um efeito motivacional independente da presença de comportamentos do tipo depressivo.	60
5.2.3	O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade em animais EAE.	62
5.3	O tratamento com VU0409551 normaliza o aumento dos níveis de IL-17 observados no baço de animais EAE.	65
5.4	O tratamento com o VU0409551 regula negativamente proteínas e vias do sistema imune em animais EAE	68
5.5	O tratamento com VU0409551 diminui o número de astrócitos em animais EAE. 73	
5.6	O tratamento com VU0409551 diminui a expressão de mRNA de marcadores de oligodendrócitos associados a doenças em animais EAE.	75

5.7	Animais EAE tratados com VU0409551 não apresentam aumento de micróglias no córtex e o número de micróglias é influenciado pela pontuação clínica dos animais.	78
5.8	Quanto maior a pontuação clínica dos animais, menor o comprimento médio do ramo das micróglias	82
5.9	Micróglias TNF+ estão aumentadas no grupo EAE Veículo, mas não no grupo EAE VU.	85
6	DISCUSSÃO	88
7	CONCLUSÃO	93
8	REFERÊNCIAS	94
9	ANEXOS	112
9.1	Tabelas de dados obtidos através de espectometria de massas	112
9.2	Certificado de comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFMG...	119
9.3	Artigo científico publicado	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esclerose múltipla: a principal causa de incapacidade não traumática em jovens adultos

Cerca de 3 a 5% da população mundial apresenta alguma doença autoimune (Scherlinger et al., 2020; Wang; Wang; Gershwin, 2015). A Esclerose Múltipla (EM), doença autoimune mais comum entre jovens e adultos com cerca de 2,8 milhões de pessoas portadoras, é uma doença do sistema nervoso central (SNC) com características de neurodegeneração, inflamação crônica, autoimunidade e desmielinização (Dobson; Giovannoni, 2019; Karussis, 2017). Indivíduos do sexo feminino têm o dobro de chances de desenvolver EM, chegando à proporção de 4:1 em relações aos homens em alguns países (Gold et al., 2019; Walton et al., 2020). Além disso, mulheres portadoras de EM podem apresentar até quatro vezes mais lesões inflamatórias no SNC do que portadores do sexo masculino (Nathoo et al., 2024).

A EM é subdividida em três tipos: Remitente-recorrente (EMRR), secundariamente progressiva (EMSP) e primariamente progressiva (EMPP). Cerca de 85% a 90% dos pacientes desenvolvem a forma EMRR, caracterizada por episódios agudos que regredem espontaneamente. Após alguns anos, 50%-80% dos portadores de EMRR acabam desenvolvendo a EMSP, acumulando incapacidades de forma irreversível. A EMPP afeta apenas 10% a 15% dos pacientes, onde a progressão irreversível ocorre desde o início da doença (Dendrou; Fugger; Friese, 2015; Fournier et al., 2023). A EM é uma doença multifatorial, desenvolvida através da junção de susceptibilidade genética e fatores ambientais (Baecher-Allan; Kaskow; Weiner, 2018b; Dendrou; Fugger; Friese, 2015; Hojati, 2017; Karussis, 2017). O desenvolvimento da EM acontece a partir da junção de susceptibilidade genética e fatores ambientais. Já foi demonstrado que existem, ao menos, 233 variantes genéticas que predispõem ao risco de desenvolver EM: uma variante no cromossomo x, 32 variantes no complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e 200 variantes no complexo não-MHC, porém proximais ou dentro de genes relacionados ao sistema imune (Patsopoulos et al., 2019). Além da genética, fatores ambientais como baixa exposição solar, tabagismo, deficiência de vitamina D, obesidade e infecções virais

(ex.: infecção pelo Epstein-Barr) também contribuem para o desenvolvimento da EM (Cotsapas; Mitrovic, 2018).

Nos pacientes com EM os sintomas mais comuns são a fadiga crônica, diminuição de função de esfíncteres, fraqueza muscular, dor, dificuldade na fala, alterações de visão (como a neurite óptica) e de funções motoras (Solomon et al., 2023; White; White; Russell, 2008). Porém, a apresentação clínica desses sintomas pode variar em função da região mais afetada no SNC (Lassmann, 2019). Além disso, sintomas neuropsiquiátricos como ansiedade e depressão, desordens neuropsiquiátricas mais comuns na EM, podem, inclusive, acontecer antes mesmo dos primeiros sintomas característicos da EM (Binzer et al., 2019; Jellinger, 2024b; Marrie et al., 2015; McKay et al., 2018).

Os sintomas neuropsiquiátricos na EM aparecem pela junção de fatores biológicos e psicossociais (Kocovski et al., 2021; Korostil; Feinstein, 2007; Li et al., 2023b; Mariki et al., 2023). Entre os fatores biológicos estão a inflamação e os circuitos neuronais anormais na amígdala e no córtex cerebral (McEwen; Nasca; Gray, 2016; Sarno; Moeser; Robison, 2021). Já os fatores psicossociais vão desde o sexo, idade, falta de suporte social, até fatores estressores, no geral. Doenças neuropsiquiátricas são extremamente impactantes no dia a dia das pessoas portadoras de EM, sendo comumente negligenciadas na prática clínica, o que pode levar até à diminuição de aderência ao tratamento (Tarrant et al., 2011; Van Egmond et al., 2022). Os sintomas da ansiedade e depressão podem se intensificar com a progressão da doença, em uma relação bidirecional (McKay et al., 2018; Peres et al., 2022). Apesar de permanecer inconsistente a causalidade entre desordens neuropsiquiátricas e a progressão da EM os primeiros achados enfatizam a importância da mitigação das potenciais consequências destas comorbidades sobre portadores de EM.

1.1.1 Fisiopatologia: entendendo os mecanismos por trás da apresentação clínica

Uma das características mais importantes da EM é a desmielinização, processo no qual ocorre a perda da bainha de mielina através de um processo autoimune (Chapman et al., 2022). Como consequência, portadores de EM têm um déficit na condução de impulsos nervosos e a transmissão sináptica, além de uma série de respostas inflamatórias e degenerativas (Martinsen; Kursula, 2022). Além da desmielinização, processos envolvendo infiltração de células imunes da periferia

através das barreiras que protegem o SNC, inflamação, neurodegeneração, reatividade de células gliais (gliose), secreção de citocinas e quimiocinas são comumente observados (Baecher-Allan; Kaskow; Weiner, 2018a; Lazo-Gomez et al., 2019; Matthews, 2019).

Uma das principais questões em aberto sobre a EM se diz respeito ao local onde a doença se inicia: periferia ou SNC. A teoria *outside-in*, da periferia para o SNC, é a mais aceita atualmente. Segundo essa teoria, a resposta autoimune seria montada na periferia e, a partir daí, células do sistema imune seriam recrutadas para o SNC, onde, a partir de uma série de eventos, resultariam nas características fisiopatológicas da EM (Dendrou; Fugger; Friese, 2015). Na teoria *inside-out*, do SNC para a periferia, a desmielinização e processos neurodegenerativos se iniciariam por algum estímulo interno no SNC e, a partir disso, ocorreria a atração de células da periferia e uma resposta autoimune seria montada. Alguns pesquisadores concluem que ambas as teorias podem ser verdadeiras, porém, cada uma seria aplicada a um subtipo diferente da EM. No subtipo remitente-recorrente, o início aconteceria na periferia. Já na forma progressiva, os primeiros sinais seriam predominantemente no SNC (Morgan; Gommerman; Ramaglia, 2021; Titus et al., 2020). Independentemente do início da doença ocorrer na periferia ou no SNC, os principais eventos celulares e moleculares ocorrem em ambas as situações, incluindo a inflamação e a participação do sistema imune. A inflamação, embora presente durante todas as fases da EM, intensifica-se nas fases iniciais, tornando-se menos intensa nas fases crônicas. A entrada de células do sistema imune inatas e adaptativas vindas da periferia para o SNC também acontece, majoritariamente, nas fases iniciais (Dendrou; Fugger; Friese, 2015).

No caso da teoria *outside-in*, de fora do SNC para dentro, células T autorreativas, células B e células da imunidade inata ultrapassam as barreiras do SNC, que estão disfuncionais. Ao chegarem no SNC, liberaram citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatórios e neurotóxicos e, por consequência, induzem a ativação de mais células da periferia e células residentes. Ocorre expansão clonal de células Th1 e Th17. Células gliais residentes, como micróglias e astrócitos, tornam-se ativadas. Esta ativação de células infiltrantes e residentes desencadeia a produção de diversos mediadores que se encarregam de destruir a mielina dos oligodendrócitos e induzir danos axonais e morte neuronal (McGinley et al., 2018).

1.2 Encefalomielite autoimune experimental: o principal modelo por trás da base teórica e terapêutica da esclerose múltipla

O modelo de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) é o modelo animal mais utilizado para estudar a EM. A EAE tem mecanismos complexos e que se assemelham fortemente com a fisiopatologia da EM. Este modelo é capaz de reproduzir aspectos essenciais da EM, como a inflamação, desmielinização, perda axonal e gliose (Constantinescu et al., 2011b). Devido à similaridade dos componentes neuro e imunopatológicos, o modelo EAE é frequentemente utilizado para avaliar os mecanismos subjacentes a estes processos e, até mesmo, para o desenvolvimento e validações de tratamentos para a EM (Farooqi; Gran; Constantinescu, 2010). Além do uso como modelo para EM o EAE também é utilizado como modelo para diversas doenças autoimunes e inflamatórias do SNC como, por exemplo, a neuromielite óptica, doença associada a anticorpos da glicoproteína de oligodendrócitos de mielina (MOGAD) e a encefalomielite disseminada aguda monofásica (ADEM) (Capper et al., 2025; Constantinescu et al., 2011a).

O curso clínico da EAE é algo previsível e bem documentado em estudos anteriores (Bittner et al., 2014; Wheeler et al., 2020). A indução ocorre no dia 0 dias pós imunização (dpi) e, ao longo dos 9-10 dias subsequentes, os animais não apresentam nenhuma manifestação clínica (Bittner et al., 2014x). Esta fase é comumente chamada de “fase pré-clínica”, encerrando assim que as primeiras inabilidades clínicas aparecem. Em seguida, por volta do dia 14-16 dpi, ocorrem as manifestações mais acentuadas dos sintomas. Esta fase é chamada de “pico” e, até que os animais entrem nessa fase, evoluem com piora clínica diária. Após este processo, vem a “fase de remissão” do modelo, após o 25-28 dpi, onde os animais já estão se recuperando parcialmente do período de maior inabilidade clínica (Bittner et al., 2014; Wheeler et al., 2020). As características físicas apresentadas ao longo da evolução do modelo também são previsíveis: paralisia da cauda dos animais, seguida por paralisias ascendentes, iniciando na cauda e membros posteriores até progredirem para os membros anteriores. À medida que os apresentação clínica vai se agravando, ocorre perda de peso. A avaliação do conjunto de sintomas ocorre através de uma escala de pontuação clínica, que avalia as características observadas dentre aquelas que são esperadas clinicamente. Uma ampla variedade de escalas de pontuação clínica pode ser utilizada, das quais possuem diferentes níveis de

complexidade e detalhamento. As escalas mais utilizadas avaliam, por exemplo, a marcha, a fraqueza de membros e presença/ausência de paralisia total ou parcial da cauda e dos membros posteriores e anteriores (Bittner et al., 2014; Wolfensohn et al., 2013).

A EAE pode ser induzida por dois modos principais: via ativa e via passiva. Na forma de imunização ativa são utilizados peptídeos ou proteínas derivados da mielina e a imunização passiva ocorre pela transferência de linfócitos T CD4⁺ ativados (Dedoni et al., 2023; Robinson et al., 2014). O modelo pode ser induzido em diversas espécies, como os animais das ordens dos primatas e os roedores. Porém, a maioria dos estudos se concentra na utilização de roedores. Camundongos e ratos desenvolvem o melhor modelo para avaliar a EAE monofásica aguda, remitente-recorrente e crônica progressiva (Ransohoff, 2012; Procaccini et al., 2015). Particularmente, camundongos C57BL/6 são os mais utilizados para este modelo (Ransohoff, 2012). A indução da EAE em animais C57BL/6 ocorre, na maioria das vezes, através da aplicação de uma emulsão contendo MOG35-55, adjuvante completo de Freund e adição de *Mycobacterium tuberculosis*. A composição desta emulsão permite que a exposição aos antígenos ocorra através de uma liberação lenta, sustentada e prolongada. Além da emulsão, os camundongos são injetados com toxina Pertussis no dia da indução e 2 dias depois. Estes componentes são utilizados para induzir inflamação e autoimunidade e, assim, iniciar o processo de ataque ao SNC (Ransohoff, 2012). O adjuvante de Freud e *Mycobacterium tuberculosis* vão induzir uma resposta voltada para o perfil Th1, aumentar a resposta imune periférica e a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Bjelobaba et al., 2018a; Rabchevsky et al., 1999). O mecanismo pelo qual a toxina Pertussis atua para induzir o modelo ainda não é completamente elucidado. Porém, há indícios que ela facilite a entrada de células imunes no SNC, quebre a tolerância de células T e aumente a proliferação de células T e a produção de citocinas por estas células (Bjelobaba et al., 2018a; Waldner et al., 2000).

Após a imunização, iniciam-se os eventos imunológicos característicos da EAE, que reproduzem aspectos centrais da fisiopatologia da Esclerose Múltipla (EM) e foram fundamentais para a formulação e sustentação da teoria “de fora para dentro” (*outside-in*). Nesse modelo, antígenos da mielina são apresentados nos órgãos linfoides periféricos, promovendo a ativação de linfócitos T autorreativos, que passam por maturação e expansão clonal (Goverman, 2009; Ronchi et al., 2016).

Diferenciadas em células efectoras, essas células T específicas para mielina entram na circulação sanguínea e, por meio da ação coordenada de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas e sinais endoteliais, conseguem transpor a barreira hematoencefálica, cuja integridade é comprometida nesse processo (Marchetti; Engelhardt, 2020). Uma vez no espaço perivascular ou já no interior do SNC, as células T são reativadas ao reconhecerem novamente seus antígenos, agora apresentados por micróglias, macrófagos e astrócitos. Essa reativação perpetua a resposta inflamatória, promovendo ativação contínua de células T e o recrutamento de outras populações imunes periféricas. Citocinas como IL-17, GM-CSF, IFN- γ e TNF desempenham papel central na expansão de subpopulações Th1 e Th17, que contribuem para a escalada inflamatória (McGinley et al., 2018). O processo culmina na ativação de células residentes e infiltradas, levando à liberação de mediadores inflamatórios e citotóxicos que promovem desmielinização, dano axonal e neuronal. Esses eventos refletem os principais marcos fisiopatológicos da EAE e da EM, resultando no comprometimento neurológico característico desses quadros (Constantinescu et al., 2011a).

1.3 Receptor metabotrópico de glutamato do tipo 5 (mGluR5): modulando a neuroinflamação e neurodegeneração

Existem duas famílias de receptores glutamatérgicos: receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Reiner; Levitz, 2018). Os receptores ionotrópicos de glutamato (iGluR) são responsáveis pela grande maioria das neurotransmissões excitatórias rápidas, sendo expressos na maioria dos neurônios do sistema nervoso central (Bowie, 2008). A neurotoxicidade glutamatérgica é mediada principalmente pela ativação de receptores ionotrópicos, como os receptores do tipo N-metil D-Aspartato (NMDA) (Guo et al., 2017). Os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) possuem função modulatória, lenta e duradoura, permitindo ajustes finos da regulação de glutamato e de suas funções, além de serem capazes de modular iGluRs (Peterlik; J. Flor; Uschold-Schmidt, 2016). Graças a seus efeitos modulatórios e sua especificidade de localização, os mGluRs vêm sendo apontados como possível alvo para intervenção terapêutica em diversas doenças neurodegenerativas, entre elas a EM (Crupi; Impellizzeri; Cuzzocrea, 2019; Planas-Fontánez; Dreyfus; Saitta, 2020; Ribeiro et al., 2017; Ribeiro; Pires; Ferguson, 2011; Spampinato et al., 2018a).

Os mGluRs são da família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), os quais se dividem em 8 subtipos e três grupos de receptores de mGluR. O grupo I inclui os receptores mGluR1 e mGluR5, o grupo II inclui o mGluR2 e mGluR3 e o grupo III inclui o mGluR4, mGluR6, mGluR7 e mGluR8 (Dogra; Conn, 2021; Witkin; Pandey; Smith, 2022). A expressão dos receptores mGluR tipo I no cérebro de roedores varia de acordo com a região observada. Por exemplo, o mGluR1 é expresso no hipocampo, cerebelo e substância negra, já o mGluR5 é expresso no hipocampo, amígdala, estriado, núcleo accumbens e córtex (Su et al., 2022). Suas distribuições nas sinapses glutamatergicas é principalmente nos terminais pós-sinápticos, porém, o mGluR5 também pode ser encontrado no pré-sináptico (He et al., 2019; Su et al., 2022). Células do SNC, como neurônios e células gliais, expressam receptores do grupo I, os quais também são expressos em células periféricas como as células do timo, além de células T e B (Nicoletti, 2008; Pacheco et al., 2004; Spampinato et al., 2018b). Os mGluRs do grupo I podem participar de processos envolvendo neuroproteção, comunicação entre células gliais e neurônios, plasticidade sináptica e outros (Batista et al., 2016a; Niu et al., 2020; Winder; Conn, 1996).

Em astrócitos reativos ocorre regulação positiva da expressão de mGluR5 (Aronica et al., 2000; Ferraguti et al., 2001). A relação da reatividade de astrócitos e mGluRs é apontada como um novo caminho terapêutico para doenças neurodegenerativas (Planas-Fontánez; Dreyfus; Saitta, 2020). A ativação de mGluR5 inibe a neuroinflamação e neurotoxicidade associada a micróglia, além de modular reatividade microglial e manipular a resposta inata em micróglia (Byrnes et al., 2009a; Loane et al., 2009; Liu et al., 2014; Zhang et al., 2021). Este receptor pode, ainda, manipular a resposta imune inata em micróglia (Liu et al., 2014).

Diversos autores demonstram o papel central de mGluR5 em diversas patologias, como as doenças neurodegenerativas e desordens neuropsiquiátricas (Bruno et al., 2017; Dogra; Conn, 2021; Esterlis et al., 2022; Niswender; Conn, 2010; Ribeiro et al., 2017). Especificamente para EM, foi observado um aumento na expressão de mGluR5 astrocítico em lesões características da doença e em amostras de tecido cerebral de pacientes com EM (Geurts et al., 2003). Ainda, foi registrado um aumento de mGluR5 no cerebelo em camundongos que passaram pelo processo da indução da EAE e em amostras de pacientes com EM. Neste mesmo estudo, avaliaram o tratamento com antagonista de mGluR5, 2-metil-6-(feniletinil)-piridina (MPEP), não sendo observada nenhuma melhora da coordenação motora de animais

EAE (Fazio et al., 2008). O uso do MPEP foi testado em outros estudos com modelo EAE utilizando ratos, não sendo observada nenhuma alteração da massa corporal, déficits neurológicos ou duração da doença em função do antagonista de mGluR5 (Dąbrowska-Bouta et al., 2015; Sulkowski; Dąbrowska-Bouta; Struzyńska, 2013). Contudo, apesar dos indícios não apontarem para diferenças significativas utilizando antagonistas deste receptor, um estudo utilizando o modelo tóxico de desmielinização causado pela Cuprizona demonstrou que o tratamento com CHPG (agonista de mGluR5) é capaz de melhorar a mielinização através do aumento da expressão de BDNF astrocitário em camundongos (Saitta et al., 2021).

A ativação de mGluR5 pode desencadear diversas vias, canônica e não canônicas (Abd-Elrahman; Ferguson, 2025). Um estudo in-vitro demonstrou que o trabalho cooperativo de dois receptores, CB1 e mGluR5, através da ativação de MEK/ERK1/2 e PI3K/AKT, promove a ativação de vias de sinalização celular pró sobrevivência neuronal (Batista et al., 2016b). Ao avaliarem uma substância antidepressiva, Saikosaponina D, observaram que ela exercia sua atividade antidepressiva através da sinalização de Homer1 – mGluR5 – mTOR (Liu et al., 2022). Desta forma, sabe-se que a ativação do receptor mGluR5 pode levar a diversos efeitos através de várias vias. Aqui, na figura 1, estão exemplificadas duas destas possíveis vias. A via clássica, que é mediada por IP3/Ca²⁺, pode levar à liberação de cálcio e suas funções efetoras, enquanto a via alternativa desencadeia respostas neuroprotetoras (Figura 1).

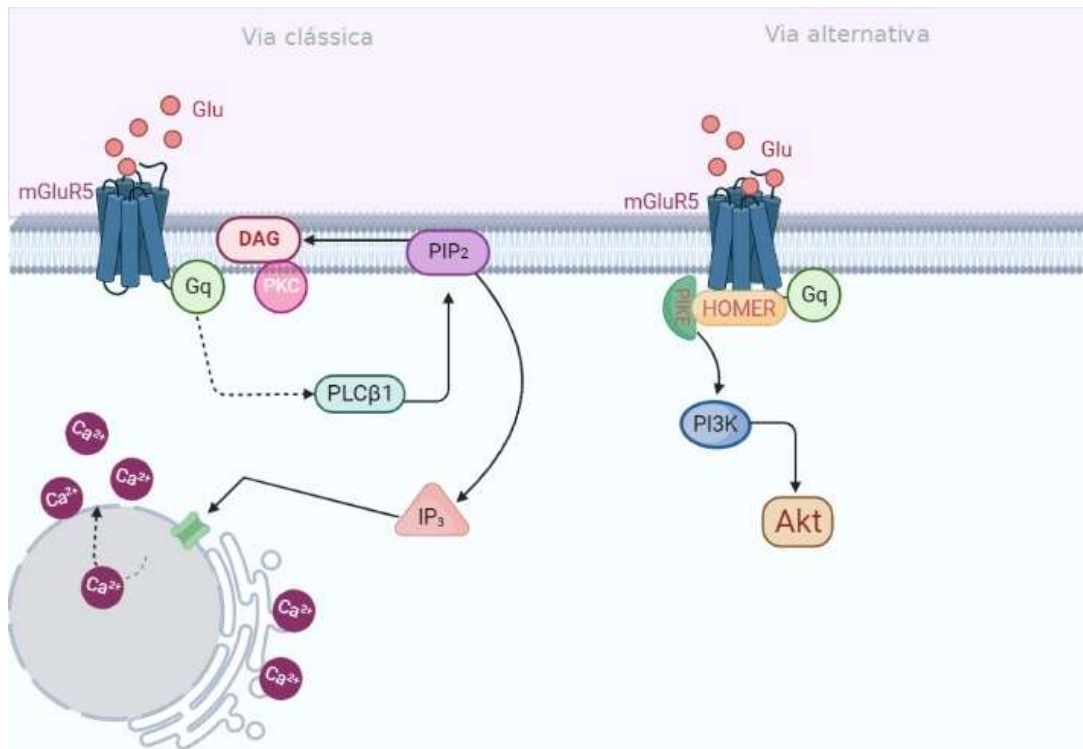


Figura 1 – Modelo para vias de sinalização do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5). A ligação de glutamato no mGluR5 pode levar à ativação de duas vias distintas. Na via clássica, ocorre a ativação da proteína Gq, responsável por ativar a fosfolipase C β 1 (PLC β 1) que irá clivar fosfatidilinositol-4,5 bifosfato (PIP2) em 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol inositol1,4,5-trifosfato (IP3) que, por sua vez, se ligará a seus receptores intracelulares (IP3R) no retículo endoplasmático (RE), liberando Ca $^{2+}$. A via alternativa é responsável por ativar sinalizações relacionadas à neuroproteção. Nesta via ocorre o envolvimento do complexo HOMER-PIKE, ativando P13K, que leva à fosforilação da proteína quinase B (AKT). Fonte: da autora, arquivo próprio.

1.3.1 Modulação alostérica positiva de mGluR5: emergindo um possível tratamento para doenças neurodegenerativas?

A maioria das drogas criadas para interferir na ativação de algum tipo de receptor é construída a partir de uma molécula capaz de atuar no mesmo sítio onde o ligante interage com o receptor (sítio ortostérico) (Budgett et al., 2022; Henter; Park; Zarate, 2021; Stansley; Conn, 2019). Desta forma, a droga pode exercer função de ativação ou inibição daquele receptor específico. Outro tipo de modulação de receptores é a modulação alostérica positiva (MAP) ou negativa (MAN). Neste tipo de modulação, o modulador utiliza um sítio completamente diferente do ligante (sítio alostérico) e, assim, facilita ou dificulta a sinalização do receptor (Budgett et al., 2022; Henter; Park; Zarate, 2021; Luessen; Conn, 2022a; Stansley; Conn, 2019). A ativação do sítio alostérico tem o potencial de desencadear “cooperatividade”, onde a ligação ao sítio alostérico pode modular o receptor em questão através de alterações na

afinidade e/ou eficácia ao agonista ortostérico (Christopoulos; Kenakin, 2002). Neste tipo de modulação, a atividade fisiológica do receptor não é completamente silenciada ou ativada (Christopoulos; Kenakin, 2002; Melancon et al., 2012). Sobre os mGluRs, já foi demonstrado que a modulação alostérica leva a efeitos promissores em diversas doenças neurodegenerativas com contextos semelhantes à EM. Por exemplo, a modulação alostérica positiva de mGluR5 com 3-ciano- N -(1,3-difenil-1 H -pirazol-5-il) (CDPPB) desencadeia neuroproteção através da ativação de AKT in-vitro (Guan et al., 2015). Em um modelo da doença de Huntington, o tratamento com CDPPB aumentou ativação de AKT e ERK1/2, além de reduzir neurodegeneração e melhorar parâmetros motores destes animais (Doria et al., 2015) Através da via ERK e AKT, mGluR5 protege contra lesão cerebral traumática in-vitro e in-vivo (Chen et al., 2012).

Ao utilizar um outro modulador alostérico positivo, o VU0360172, foi observada uma resposta anti-inflamatória microglial, por meio de AKT, que desencadeava a inibição de GSK-3 β que, por sua vez, regulava fosforilação de CREB, levando à regulação da expressão de genes relacionados à inflamação microglial (Bhat et al., 2021a). Porém, ainda existe uma ambivalência de resultados na literatura científica quanto à utilização benéfica de moduladores positivos ou negativos (Conde-Ceide et al., 2015; Doria et al., 2018a; Hovelso et al., 2012; Luessen; Conn, 2022a). Já se sabe que o MAP VU0409551 pode privilegiar uma via alternativa de sinalização do receptor mGluR5 (Scherlinger et al., 2020; Wang; Wang; Gershwin, 2015), levando à efeitos neuroprotetores (Figura 2). Esta forma de privilegiar a estimulação de uma via específica pode ser chamada de modulação enviesada (Hellyer et al., 2020; Sengmany et al., 2020). Além disso, utilizando o VU0409551, observou-se melhora de déficits cognitivos e déficits de neuroplasticidade em modelos animais de esquizofrenia, além de melhorar a plasticidade sináptica e memória em um modelo animal de doença de Huntington (Balu et al., 2016; Brown et al., 2022; Doria et al., 2018b). Apesar de termos um estudo promissor que demonstra efeito benéfico da ativação de mGluR5 no contexto da EM (Saitta et al., 2021), ainda não existem estudos que testem a funcionalidade de um tratamento utilizando modulador alostérico positivo de mGluR5 em modelos de EM.

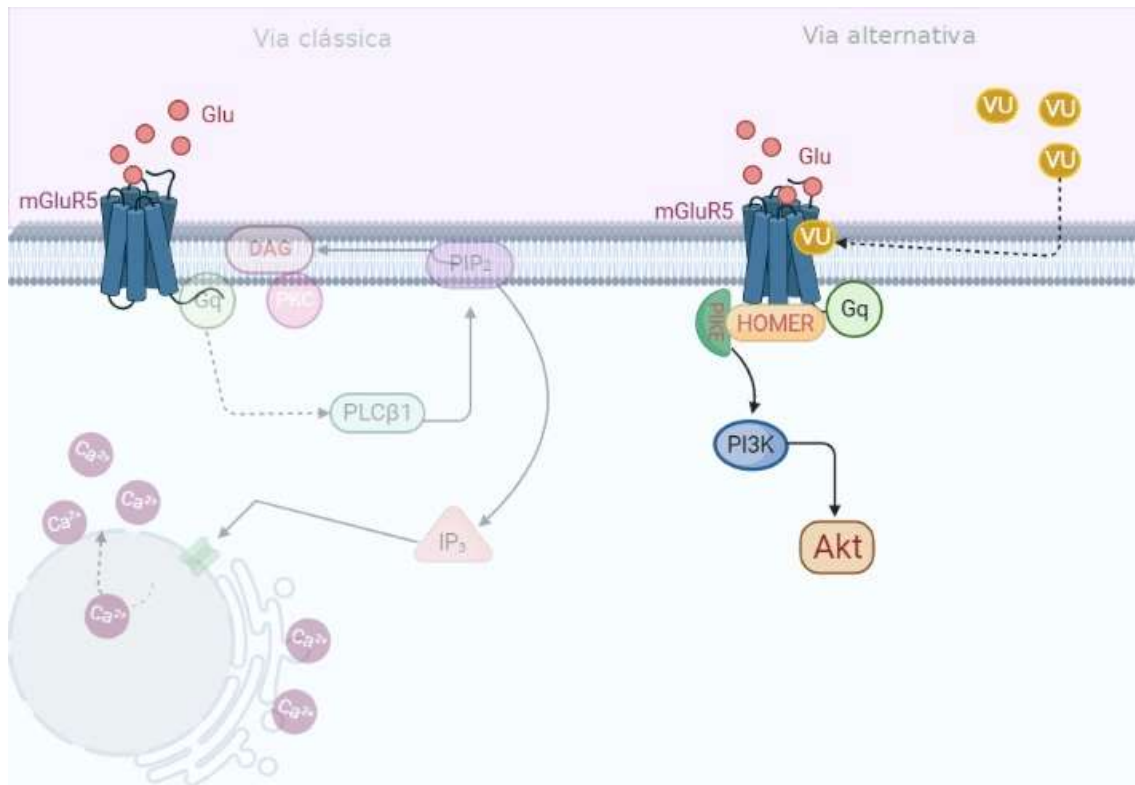


Figura 2 – Modelo via de sinalização do receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5) quando estimulado pelo modulador alostérico positivo (MAP), VU0409551. A ligação de VU0409551 ao sítio alostérico de mGluR5 prioriza a via alternativa de sinalização em detrimento da via clássica. A via alternativa é caracterizada pela ativação do complexo HOMER-PI3K, ativando PI3K, que leva à fosforilação da proteína quinase B (AKT). Esta via leva a cascatas de reações que culminam em neuroproteção. Fonte: da autora, arquivo próprio.

1.4 Terapias modificadoras de doença: um sucesso parcial

Os pacientes com EM podem evoluir clinicamente de duas formas: piora associada à recaída (RAW) ou com uma progressão independente da atividade de recaída (PIRA) (Lublin et al., 2022). Uma recaída da EM define-se pela ativação e migração de células imunes periféricas para o SNC (Oh; Bar-Or, 2022). Porém, a progressão da EM pode acontecer sem estas recaídas e, neste caso, ser efetivada principalmente por mecanismos degenerativos e pela inflamação compartimentada: células T, B e outras células imunes periféricas confinadas no SNC (Lassmann, 2018). Entretanto, as terapias modificadoras de doença (TMD) aprovadas para a EM são majoritariamente baseadas no sistema imune periférico e, com isso, não são eficazes em prevenir a progressão independente de recaídas, degeneração neuronal, progressão pela perda de mielina e no reparo de lesões que já ocorreram (Correale et al., 2021; Montalban et al., 2018; Oh; Bar-Or, 2022).

A EM é uma das doenças neurodegenerativas com maior número de TMDs disponíveis. Porém, isso não significa que os desafios de tratamento de pessoas com EM tenham sido sanados, principalmente pacientes portadores das formas progressivas. Há uma necessidade emergente em descobrir novos alvos terapêuticos que consigam ser efetivos em pontos falhos das demais terapias existentes (Bellanca et al., 2024a; Olejnik et al., 2024a). Atualmente, as intervenções terapêuticas para EM se dividem em três tipos: terapia para controle de surtos/exacerbações agudas; terapias que alteram o curso da doença (as TMDs) e terapias para tratar sintomas decorrentes das exacerbações passadas (Olejnik et al., 2024a). As TMDs atuam, em sua maioria, no sistema imune periférico, de forma a modular o sistema imune, impedir o tráfico de células e/ou depletar células do sistema imune (Charabati et al., 2023). O SNC e suas células chave na fisiopatologia da EM, ao exemplo dos astrócitos e micróglia, não têm sido alvos claros das TMDs. Algumas TMDs apresentam influência em células gliais, porém, são discretas quando comparadas a grandeza dos papéis desempenhados por estas células (Guerrero; Sicotte, 2020; Ponath; Park; Pitt, 2018).

O objetivo das TMDs é levar a uma diminuição de parâmetros importantes no contexto da EM, como acúmulo de incapacidades, risco de recidiva e PIRA (Bellanca et al., 2024b; Freedman et al., 2013). As TMDs são subdivididas em terapias de baixa/moderada eficácia e terapias de alta eficácia (Olejnik et al., 2024b; Vasileiou; Fitzgerald, 2023). Dentre as terapias de baixa/moderada eficácia, que são utilizadas para tratar a EMRR, destacam-se IFN- β , acetato de glatirâmero e fumarato de dimetila. O IFN- β , regulador da expressão de citocinas, tanto inflamatórias quanto anti-inflamatórias, modula inflamação no SNC, reduzindo a entrada de células T no SNC, inibindo a divisão de células T e induzindo células Treg e células B supressoras (Charabati et al., 2023; Shapiro et al., 2003; Vasileiou; Fitzgerald, 2023). Já o acetato de glatirâmero é capaz de inibir a desmielinização inflamatória por se assemelhar à proteína básica de mielina (MBP), compete com a ligação peptídica ao MHC, reduz a resposta inflamatória contra as bainhas de mielina verdadeiras, além de aumentar células Th2 e diminuir apresentação de antígeno (Charabati et al., 2023; Johnson et al., 1995; Schrempf; Ziemssen, 2007; Tselis; Khan; Lisak, 2007). O fumarato de dimetila, medicamento já utilizado na psoríase, foi aprovado para utilização na EM. Ele pode modular vias relacionadas a ações antioxidantes, aumentar concentração de células T FoxP3 (Treg) e reduzir T CD8⁺ (Células T citotóxicas) e diminuir migração de células imunes pela barreira hematoencefálica (Charabati et al., 2023; Olejnik et

al., 2024b). No entanto, em função ao perfil de segurança, as terapias de baixa/moderada eficácia possuem uma série de efeitos colaterais e indesejáveis. Estes efeitos podem ser reações no local da injeção, quando aplicado por esta via, elevação das enzimas hepáticas, fraqueza e cansaço, distúrbios gastrointestinais, insuficiência hepática, entre outros (Amin; Hersh, 2023a; Jalkh et al., 2021).

Entre as terapias de alta eficácia, as quais cresceram de número nos últimos anos, destacam-se fingomimode, cladribina e diversos anticorpos monoclonais. Fingomimode, primeira terapia de alta eficácia registrada neste grupo, é uma terapia da classe de moduladores de receptores S1P (esfingosina-1-fosfato), receptores responsáveis pela migração de linfócitos dos linfonodos para o sangue. Esta medicação pode ser utilizada em pacientes EMRR e EMSP, sendo capaz de bloquear o influxo de células T para o SNC, que subsequentemente exerce efeito de imunossupressão (Charabati et al., 2023; Chun; Hartung, 2010; Matloubian et al., 2004). A cladribina, por sua vez, foi anteriormente utilizada como quimioterápico e em doenças autoimunes e, hoje em dia, também é utilizada em pacientes com EMRR altamente ativa. Ela tem atividade imunossupressora, por causar depleção de linfócitos autorreativos (Charabati et al., 2023; Jacobs et al., 2018). Além disso, uma série de anticorpos monoclonais foram desenvolvidos e são utilizados como TMD na EM, os quais se enquadram nas terapias de alta eficácia. Natalizumabe, primeiro a ser registrado e pode ser utilizado na EMRR e EMSP, atua bloqueando o influxo linfocitário pela barreira hematoencefálica (Amin; Hersh, 2023a; Khoy et al., 2020).

Ademais, existem uma série de agentes anti-CD20, como o rituximabe, ocrelizumabe, ublituximabe e ofatumumabe, que podem depletar células B através de mecanismos de citotoxicidade. Rituximabe, ublituximabe e ofatumumabe atuam na EMRR, sendo ocrelizumabe o único capaz de atuar também na EMPP (Chmielewska; Szyndler, 2023; De Sèze et al., 2023; Olejnik et al., 2024b). Dentre todas as terapias de alta eficácia aqui mencionadas, são observados vários efeitos colaterais e relacionados ao perfil de segurança, indo desde sintomas de simples resolução (ex.: dor de cabeça, vômitos, fadiga), até complicações mais sérias, como elevação de enzimas hepáticas, efeitos cardiotoxicos, linfocitopenia, leucoencefalopatia multifocal progressiva, aumento de infecções, doenças malignas como cânceres, doenças psiquiátricas e outras complicações (Amin; Hersh, 2023a; Jalkh et al., 2021). Além disso, as TDMs ainda falham em muitos aspectos, como, por exemplo, em evitar a progressão da doença. Uma porcentagem de pacientes que recebem as TDMs de alta

ou baixa/moderada eficácia apresentam acúmulo de incapacidades, seja por recuperação incompleta de recaídas, ou por PIRA (Chylińska et al., 2023; Gonzalez-Lorenzo et al., 2024; Guerra; Iaffaldano, 2025). As taxas de recidivas de pacientes em uso das TDMs, quando comparadas a placebos ou outras TDMs, variam de 33% a 68% (Olejnik et al., 2024b). Deste modo, existem esforços da comunidade científica em torno dos pontos negativos das TDMs, visando encontrar terapias que tenham um perfil de segurança melhor e que garanta aos pacientes que a progressão da incapacidade será sanada.

2 JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a EM é a doença neurológica não traumática mais comum em adultos jovens. Estima-se que em todo o mundo a EM afete aproximadamente cerca de 2.8 milhões de pessoas (WALLIN et al., 2019; WALTON et al., 2020). No Brasil, a prevalência da doença é de cerca de 4 a cada 100.000 pessoas. Ainda não se sabe exatamente a etiologia da doença, que pode ser desencadeada por diversos fatores, como a pré-disposição genética, fatores ambientais, hormonais e infecciosos (Karussis, 2017). Apesar de existirem diversos tratamentos no mercado, pesquisas apontam que tais medicamentos só levam à melhora de alguns dos aspectos envolvidos na EM. As drogas atualmente disponíveis para o tratamento da EM concentram-se, em sua maioria, em diminuir o processo neuroinflamatório característico da doença. Porém, até o presente momento, nenhuma droga é capaz de evitar a neurodegeneração. Além disso, tais medicamentos não parecem ser capazes de atenuar a reatividade de astrócitos e micróglia. Nenhum tratamento disponível consegue reverter ou parar o curso da EM e, além disso, os medicamentos utilizados como tratamento apresentam diversas limitações, como modo de aplicação invasivo, reações adversas, não adaptação pelo paciente e a preocupação com a resposta diminuída em quadros infecciosos e em outras comorbidades associadas (Amin; Hersh, 2023b). Sendo assim, a procura de outras formas de tratamento é importante para identificar drogas mais eficientes em mitigar sintomas e até mesmo evitar a progressão da doença. Por ser uma doença multifatorial e de amplas causas e consequências, cada paciente se adapta melhor a um tipo de terapia modificadora de doença. Desta forma, aumentar a quantidade e a qualidade de tratamentos disponíveis é essencial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do tratamento com VU0409551, um modulador alostérico positivo de mGluR5, em parâmetros comportamentais, imunológicos e moleculares em um modelo murino da esclerose múltipla, a EAE.

3.2 Objetivos específicos

A EAE foi induzida em camundongos em idade adulta e os animais foram tratados com VU0409551 (10mg/kg), obtendo-se os quatro grupos experimentais:

- Camundongos controle tratados com veículo (Controle veiculo);
- Camundongos controle tratados com VU0409551 (Controle VU);
- Camundongos EAE tratados com veículo (EAE veiculo);
- Camundongos EAE tratados com VU0409551 (EAE VU)

Em seguida foi feita avaliação de padrões clínicos, comportamentais, imunológicos e moleculares, visando alcançar os objetivos descritos a seguir:

- I. Caracterizar o perfil cardiovascular de ratos *Wistar* submetidos ao AVEh experimental no córtex insular;
- II. Investigar como o tratamento com o VU0409551 interfere no score clínico dos animais EAE;
- III. Identificar alterações nos comportamentos do tipo ansiosos e depressivos de animais EAE tratados ou não com VU0409551;
- IV. Avaliar se o tratamento com VU0409551 pode alterar a porcentagem de células imunes periféricas (Th1 e Th17), além da produção de suas principais citocinas.
- V. Investigar se o tratamento com VU0409551 altera a expressão de proteínas na medula espinhal e, com isso, avaliar quais vias são reguladas positiva ou negativamente;
- VI. Identificar possíveis alterações nas populações e marcadores associados a oligodendrócitos, astrócitos e micróglia no córtex de animais EAE tratados ou não com VU0409551.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Os procedimentos experimentais com animais realizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais da UFMG (protocolo do CEUA: 170/2020). Foram utilizados camundongos machos e fêmeas C57BL/6 de oito semanas de idade adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB/UFMG, com alimentação e água *ad libitum*, temperatura controlada (23°C) e ciclo de 12 horas claro/escuro.

4.2 Modelo Murino de Encefalomielite Autoimune Experimental (EAE) e tratamento

A indução do modelo foi realizada a partir da aplicação por via subcutânea de uma emulsão contendo peptídeo de glicoproteína de oligodendrócito de mielina (MOG35-55), *Mycobacterium tuberculosis* atenuada a 4 mg/mL (*Difco Laboratories*, MD, Sparks, nº de catálogo:231141) e adjuvante Completo de Freund (do inglês *Freund Complete Adjuvant*, CFA, nº catálogo:263810) em volume igual ao de MOG35-55. Todos os animais receberam injeções intraperitoneais de Toxina Pertussis (300ng/200 µl) (*List biological laboratories, Inc.*, nº de catálogo: #180) logo após a aplicação da emulsão e 48 horas depois.

Após a realização do protocolo de indução do modelo, todos os animais foram avaliados a partir de uma escala de pontuação clínica, que atribui notas de 0 a 5 para as incapacidades adquiridas ao longo do experimento. Esta escala de pontuação clínica está demonstrada a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 – Escala de pontuação de acordo com características clínicas do modelo

Pontuação	Características
0	Nenhuma apresentação clínica
0,5	Paralisia parcial da cauda
1	Paralisia da cauda ou marcha gingada/arrastada
1,5	Paralisia parcial da cauda e marcha
2	Paralisias da cauda e marcha

2,5	Paralisia parcial do membro
3	Paralisia de um membro
3,5	Paralisia de um membro e parcial de outro membro
4	Paralisia total de membros posteriores
4,5	Paralisia completa de membros posteriores e fraqueza de membros anteriores
5	Moribundo

O tratamento com o MAP VU0409551 (Figura 3) foi preparado a partir da diluição em veículo de β -ciclodextrina (20%) e aplicado por via intraperitoneal (I.P) diariamente, a partir do dia de início do tratamento (Doria et al., 2018b). Além disso, a padronização da indução do modelo e do tratamento com VU0409551 ocorreu ao longo de três etapas, com algumas alterações ao longo do processo. Essas diferenças serão abordadas em seguida.

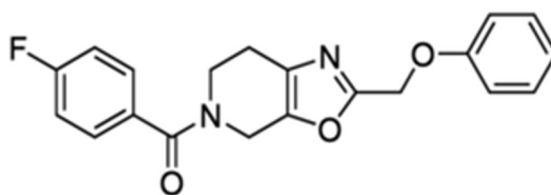


Figura 3 - Fórmula estrutural do MAP para mGluR5, VU0409551 (VU). VU é um modulador alostérico positivo seletivo, que não participa da ativação de outros receptores metabotrópicos de glutamato. Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/sml2783>

4.2.1 Primeira etapa de padronização

Os animais foram distribuídos randomicamente entre quatro grupos:

- Grupo Controle tratado com Veículo (Controle Veículo) – 4 animais;
- Grupo Controle tratado com VU0409551 (Controle VU) – 4 animais;
- Grupo EAE tratado com Veículo (EAE Veículo) – 6 animais;
- Grupo EAE tratado com VU0409551 (EAE VU) – 6 animais.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de oito semanas de idade. A concentração de peptídeo de glicoproteína de oligodendrócito de mielina foi de 100 μ g/100 μ l (MOG35-55; MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; NeoMPS). O tratamento com VU0409551 (gentilmente doado por Dr P. J. Conn, Vanderbilt Center for Neuroscience Drug Discovery, Vanderbilt Institute of Chemical Biology), diluído em

veículo de β -ciclodextrina (20%), ocorreu utilizando uma dose de 5 mg/kg em volume de 4 ml/kg.

4.2.2 Segunda etapa de padronização

Os animais foram distribuídos randomicamente entre quatro grupos:

- Grupo Controle Veículo – 4 animais;
- Grupo EAE Veículo - 6 animais;
- Grupo EAE VU10, que inicia o tratamento no dia 10 dpi – 6 animais;
- Grupo EAE VU14, que inicia o tratamento no dia 14 dpi – 6 animais.

4.2.3 Terceira etapa de Padronização

Os animais foram distribuídos randomicamente entre quatro grupos:

- Grupo Controle Veículo – 10 animais;
- Grupo Controle VU – 10 animais;
- Grupo EAE Veículo – 10 animais;
- Grupo EAE VU – 10 animais.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 fêmeas de oito semanas de idade. A concentração de MOG35-55 foi de 150 μ g/100 μ l (MEVGWYRSPFSRWHLRNGK; Proteimax). A dose do tratamento com VU0409551 utilizada nesta etapa foi de 10 mg/kg. No dia 28 dpi, os animais foram anestesiados (cetamina/xilazina (100/10 mg/Kg) e distribuídos de forma randômica para as análises. Após eutanásia, 6 animais de cada grupo passaram pela retirada dos tecidos (córtex, medula e baço). Para as análises imunohistológicas, foram destinados os outros 4 animais de cada grupo.

4.3 Comportamentos

4.3.1 Campo aberto

Conforme realizado anteriormente por Ribeiro et al., 2023, o teste de campo aberto foi empregado para avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos camundongos. O procedimento consistiu em posicionar os animais em um aparato cilíndrico e circular confeccionado em acrílico, com dimensões de 30 cm de diâmetro e 40 cm de altura. Neste ambiente, os camundongos puderam explorar livremente o espaço por 30 minutos e, durante este período, o experimento foi registrado através de uma câmera suspensa e que permitia a ampla visualização de todos os comportamentos essenciais ao teste. Após o término, os vídeos foram analisados pelo software Any-maze Video Tracking System (versão 7.48, Stoelting®). O programa forneceu dados sobre a distância percorrida, velocidade média, tempo na periferia, número de saídas da periferia, permitindo o cálculo da % de distância percorrida tanto na periferia quanto no centro do aparato.

4.3.2 Suspensão da cauda

Conforme realizado anteriormente por Ribeiro et al., 2023, os animais são presos pelos rabos em uma câmara de 3 lados que possui ganchos, que se estendem do teto da câmara. O teste dura 6 minutos e o tempo de imobilidade é medido durante os 4 minutos finais, já que quase todos os animais tentam escapar nos primeiros 2 minutos. Neste período os animais são filmados e posteriormente o vídeo é analisado (software XPLOTAT) a fim de verificar o tempo de imobilidade e a latência para início da imobilidade.

4.3.3 *Splash and grooming*

O procedimento foi realizado conforme Isingrini et al., 2010 e consiste em borrifar uma solução de sacarose a 10% no dorso do animal, em uma caixa de acrílico medindo 21,6 cm de largura e 31,6 cm de comprimento. A solução açucarada, devido à sua viscosidade, suja a pelagem do animal, induzindo o comportamento de autolimpeza (grooming). Após a aplicação da solução, os comportamentos dos animais são registrados por uma câmera por um tempo de 5 minutos. Posteriormente, o comportamento de grooming e a latência para iniciar o comportamento são analisados utilizando o software XPLOTAT.

4.3.4 Caixa claro-escuro

O teste da caixa claro-escuro foi realizado conforme anteriormente descrito por (Busch et al., 2017). Este teste é um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores. O aparato consiste em uma caixa de acrílico com dimensões de 40 x 20 cm, dividida em dois compartimentos: um claro (2/3 da caixa) e um escuro (1/3 da caixa), conectados por uma pequena abertura. O compartimento claro é iluminado com aproximadamente 500-600 lux, criando um ambiente potencialmente estressante para os animais. No momento do teste, o animal é colocado individualmente no compartimento claro, com a cabeça voltada para o lado escuro. A duração do teste é de 5 minutos. Neste período são registrados, com uma câmera, todos os comportamentos do animal. Após o término do teste, as filmagens foram analisadas utilizando o software XPLOTRAT, permitindo a aquisição dos dados de tempo total de permanência no compartimento claro e a quantidade de vezes que o animal entra no campo claro.

4.3.5 Labirinto em cruz elevado

O Labirinto em Cruz Elevado (LCE) é um modelo amplamente utilizado para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade em roedores e foi realizado conforme descrito anteriormente por (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019; Yoshizaki; Asai; Hara, 2020). O aparato consiste em um labirinto de acrílico em forma de cruz, elevado a 30 cm do solo, com dois braços abertos (30 cm de comprimento) e dois fechados (30 cm de comprimento e 50 cm de altura). Durante o teste, que dura 10 minutos, os animais exploram livremente o labirinto, e os principais parâmetros mensurados incluem tempo no braço aberto, latência para entrar no braço aberto e quantidade de entradas no braço aberto. Durante todo o período de teste uma câmera faz o registro e, após o término, as filmagens são avaliadas no software Any-maze Video Tracking System.

4.4 Cultura de esplenócitos

Os baços dos camundongos foram coletados no pico inflamatório da EAE (dia 16 após a primeira imunização com a emulsão de MOG35-55) para cultura de

esplenócitos *in vitro*. Após a coleta, o órgão foi macerado imerso em 3 mL de salina para extração das células. Em seguida, as células foram lavadas com 30 mL de salina estéril, centrifugadas a 1200 rpm/10 min/4°C e o sobrenadante foi descartado. Após lavagem, foi realizada a lise das hemácias. Para isso, as células foram incubadas em 1 mL de Tampão “*Ammonium-chloride-potassium*” (ACK) por 5 minutos. Após incubação, a lise foi interrompida adicionando-se 30 ml de salina. Os tubos foram então centrifugados a 12000 rpm/10 min/4°C e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 150 µL de meio RPMI completo (RPMI, 10% SFB, 1% HEPES, 1% Penicilina/Estreptomicina), filtradas em “*cell strainers*” de 70 µm e contadas em câmara de Neubauer usando-se *Trypan blue* para exclusão de células não viáveis. Foram plaqueadas 1 x 10⁶ células em 100 µl de meio completo por poço, em placas de 96 poços próprias para cultivo celular com fundo em U.

4.4.1 Dosagem de citocinas

Para dosagem de citocinas no sobrenadante, imediatamente após serem plaqueados, os esplenócitos foram estimulados com MOG35-55 (100 ul/poço, concentração final 10 ug/mL) ou com os controles positivos Ionomicina (100 ul/poço, concentração final 1 ug/mL) ou Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (100 ul/poço, concentração final 50 ng/mL). Aos controles negativos, foi adicionado apenas meio completo (100 uL/poço). As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂. Após 72h, os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IFN-gama, IL-10 e IL-17 por ELISA (Kits R&D System) conforme instruções do fabricante.

4.4.2 Estímulo da cultura de esplenócitos

Para citometria, imediatamente após plaqueio, os esplenócitos foram estimulados com MOG35-55 (25 ul/poço, concentração final 10 ug/mL). As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 20h. Após incubação, as placas foram centrifugadas a 12000 rpm/10 min/4°C e flicadas. Em seguida, todas as células receberam 200 uL/poço de meio RPMI completo contendo Brefeldina (5ug/mL), Ionomicina (1 ug/mL) e PMA (50 ng/mL) e foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 4h.

4.5 Citometria de Fluxo

Para marcação para citometria, as células foram primeiramente centrifugadas a 1200 rpm/4°C/7 min e flicadas para remoção do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se *FcBlock* (20ul/poço), diluído em *antibody dilution solution* (ADS), para bloqueio dos receptores de Fc, e as células foram incubadas por 20 min, a 4°C. Após essa incubação, procedeu-se à lavagem. Para isso, Wash B (200 uL/poço) foi adicionado e as células foram centrifugadas a 1200rpm/4°C/7 min e flicadas para remoção do sobrenadante. A seguir, as células foram ressuspensas no mix de anticorpos extracelulares (20 ul/poço), diluídos em ADS, e incubadas por 20 min, a 4°C, protegidas da luz. Neste momento, poços controle, foram marcados com um mix de isotipos correspondentes a cada fluoróforo usado na citometria. Após incubação, realizou-se nova lavagem como descrito acima. Após lavagem, as células foram tratadas com paraformaldeído 4% (100 ul/poço) para fixação e incubadas por 20 min, a 4°C, protegidas da luz. As células foram então centrifugadas a 1200rpm/4°C/7 min e flicadas para remoção do sobrenadante.

Posteriormente, para permeabilização, as células foram ressuspensas em *Permwash* (BD) (200 ul/poço) e incubadas por 15min, a temperatura ambiente, protegidas da luz. Logo após a incubação, elas foram centrifugadas a 1200rpm/4°C/7 min e flicadas para remoção do sobrenadante. A seguir, as células foram ressuspensas no mix de anticorpos intracelulares (20 ul/poço), diluídos em ADS, e incubadas por 30 min a 4°C, protegidas da luz. Procedeu-se a lavagem com *Permwash* (200 uL/poço), seguida de lavagem com Wash B (200 uL/poço). Por último, as células foram ressuspensas em PBS (200 uL/poço) e procedeu-se à leitura das amostras no citômetro de fluxo *Attune Acoustic Focusing Cytometer* (Life Technologies) e os resultados foram analisados usando o *FlowJo Software* (Tree Star). As estratégias de “*gating*” para análise dos linfócitos do tipo *T helper 1* (Th1) e do tipo *T helper 17* (Th17) no baço estão demonstradas na figura 4. Os anticorpos utilizados para marcação das células Th1 e Th17 estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Pannel de anticorpos para marcação em citometria de fluxo em baço

Mix de anticorpos	Marcador	Fluoróforo
Extracelular	CD3	PerCP-Cy5.5
	CD4	FITC
Intracelular	IL-17	PE
	T-bet	PE-Cy7

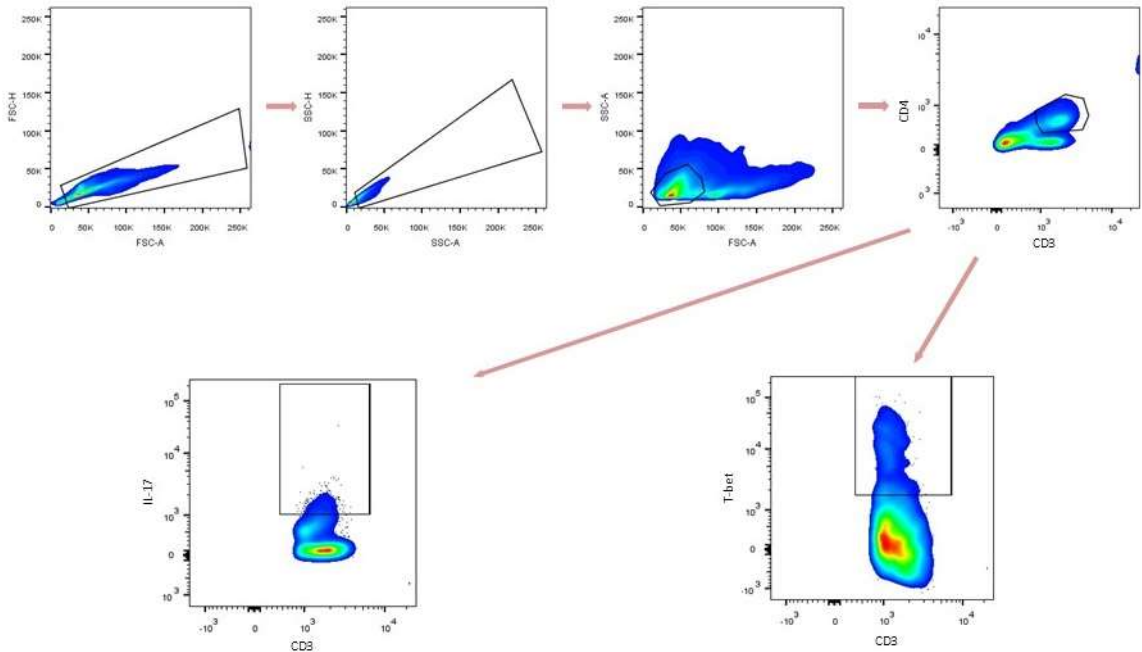


Figura 4 – Estratégia de “gating” para selecionar células Th1 e Th17 em baço. Inicialmente, os eventos únicos foram selecionados através da análise da área versus altura nos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, células foram selecionadas em gráficos SSC x FSC para posterior avaliação de linfócitos duplamente positivos CD3⁺CD4⁺. Por fim, foi analisada a frequência de linfócitos T CD4 IL-17⁺ ou T-bet⁺.

Para coleta do cérebro, os animais foram anestesiados e perfundidos com 20 mL de PBS gelado. Após perfusão, os cérebros foram coletados, armazenados em tubos contendo 10 mL de PBS e mantidos no gelo. Após coleta, procedeu-se à lise mecânica. Para isso, os cérebros foram transferidos para tubos de 5 mL, 500 uL de meio RPMI puro foram adicionados a cada amostra e os tecidos foram macerados com auxílio de um pistão de vidro. Em seguida, as amostras foram transferidas para um novo tubo de 15 mL, o volume do macerado foi completado para 7 mL com meio RPMI puro e procedeu-se à separação das células por gradiente de Percoll. Para isso,

adicionou-se a cada macerado, 3 mL da Solução Isotônica de Percoll (SIP) formando assim uma solução de aproximadamente SIP 30% vol/vol. Em outro tubo, adicionou-se 2 mL de SIP 70%. Cuidadosamente, as soluções SIP 30% foram vertidas por cima das soluções SIP 70%. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500g/30min/20°C com aceleração 1.0 e desaceleração 0. Após a centrifugação, houve a formação de um anel de células na interface 30%-70% das amostras. As células foram coletadas junto com cerca de 4 a 5 mL da camada rosa transparente que fica acima do anel. Em seguida, as células foram filtradas em “*cell strainer*” de 70 μ m e transferidas para um novo tubo. Foi adicionado PBS para lavagem das amostras completando-se o volume para 14 mL e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500g/10 min/4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 100 μ L de PBS e transferidas para placas de 96 poços com fundo em U. As placas foram centrifugadas a 12000 rpm/10 min/4°C e flicadas. Em seguida, todas as células receberam 200 μ L/poço de meio RPMI completo contendo Brefeldina (5 μ g/mL), Ionomicina (1 μ g/mL) e PMA (50 ng/mL) e foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 4h. Procedeu-se então para a marcação para citometria conforme descrito anteriormente no item 4.4.3 da metodologia deste documento. O painel de anticorpos utilizados para a citometria do cérebro está demonstrado na tabela 4. As figuras de estratégias de gating utilizadas para identificar os monócitos e micróglia estão descritos na figura 5.

Tabela 3 – Painel de anticorpos para marcação em citometria de fluxo de cérebro

Mix de anticorpos	Marcador	Fluoróforo
Extracelular	P2RY12	APC
	LY6C	PE
	CD11b	APC-Cy7
	CD45	PercP-Cy5.5
Intracelular	TNF- α	PE-Cy7
	IL-10	BV421

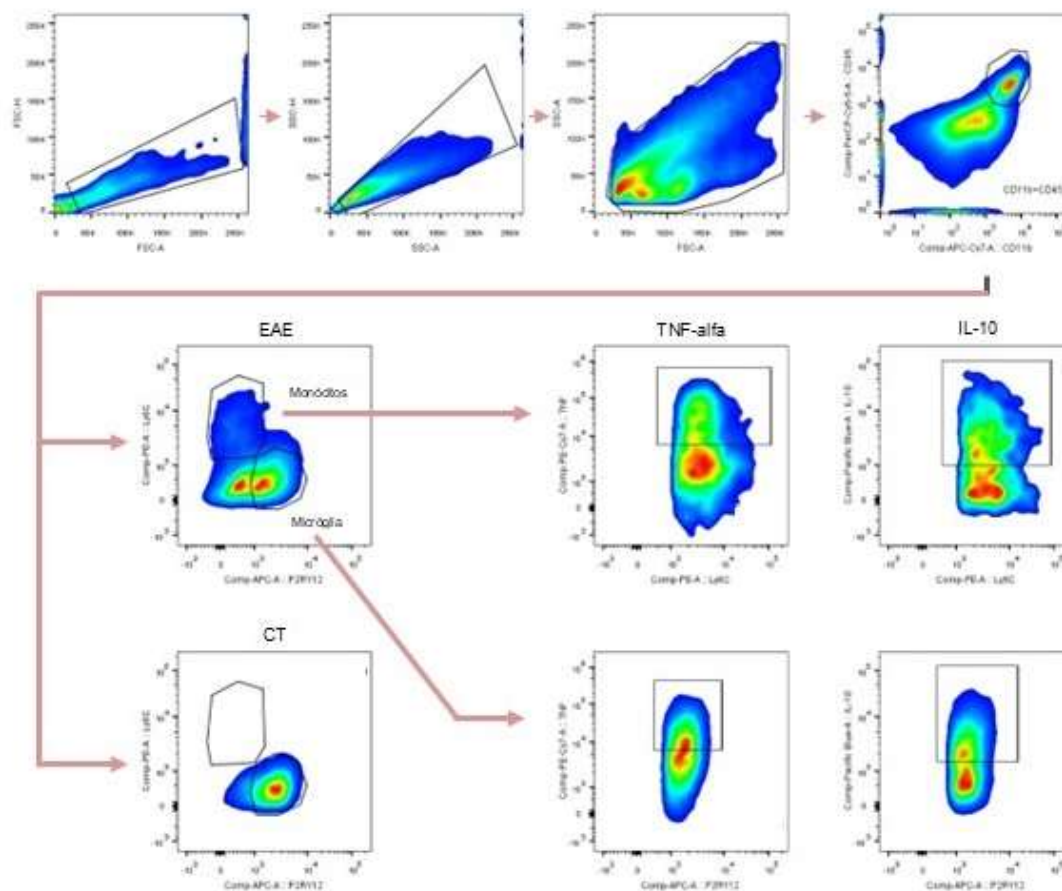


Figura 5 - Estratégia de “gating” para selecionar micróglias e monócitos em tecido cerebral. Inicialmente, os eventos únicos foram selecionados através da análise da área versus altura nos parâmetros tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Em seguida, as células totais foram selecionadas em gráficos SSC x FSC para posterior avaliação de células mieloides duplamente positivas CD11b+CD45+. Nessa seleção foi analisada a frequência de monócitos (Ly6C+P2RY12-) e de micróglias (Ly6C - P2RY12+). Por fim, foi analisada a frequência de células TNF-alfa+ ou IL-10+ em cada uma dessas populações.

4.6 Proteômica – LC- MS/MS

Os animais foram eutanasiados e, em seguida, a medula foi dissecada. O tecido foi congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a dissecação. Foram utilizados, ao todo, 10 animais, que foram subdivididos entre os grupos: Controle Veículo (n=2), Controle VU (n=2), EAE Veículo (n=3) e EAE VU (n=3). A partir disso, o tecido prosseguiu para o processamento. Todos os reagentes utilizados foram adquiridos da *Sigma-Aldrich*, exceto os inibidores de protease e fosfatase, que foram fornecidos pela Roche. As soluções foram preparadas utilizando água purificada do sistema Milli-Q (*Millipore*). Para o processamento das amostras, foram utilizados tubos

low-binding da Eppendorf, garantindo a mínima aderência de peptídeos e proteínas às superfícies dos tubos. O tecido foi inicialmente homogeneizado e sonificado em uma solução contendo 5% de desoxicolato de sódio, com o objetivo de promover a lise celular e a extração das proteínas. A solução também incluiu inibidores de protease e fosfatase (1x) e 1 mM de pervanadato de sódio, a fim de prevenir a degradação proteica e a remoção indesejada de grupos fosfato durante o processo. Para reduzir as pontes dissulfeto foi utilizado TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina), um agente redutor eficaz. Em seguida, a cloroacetamida foi empregada para a alquilação das proteínas, reagindo com os grupos tiol das cisteínas e prevenindo a formação de novas pontes dissulfeto, o que assegura maior estabilidade estrutural durante a digestão enzimática.

Após essa etapa, as proteínas foram digeridas em peptídeos pela enzima tripsina, que cliva as proteínas nas extremidades das lisinas e argininas (exceto quando o aminoácido seguinte é uma prolina). O processo de digestão resultou em uma mistura complexa de peptídeos, que foram então marcados para análise subsequente. Os peptídeos provenientes dos diferentes grupos experimentais foram rotulados utilizando dois kits TMT-10 plex, permitindo a comparação simultânea de até dez amostras distintas. Em seguida, foi aplicado um protocolo de enriquecimento específico para o fosfoproteoma, com o intuito de isolar os peptídeos que contêm resíduos fosforilados, relevantes para a análise de modificações pós-traducionais. Cada fração foi analisada no espectrômetro de massas *Orbitrap Eclipse* (Thermo Fisher), conectado ao sistema *Dionex Ultimate 3000 LC* (Thermo Fisher). O espectrômetro operou em modo dependente de dados (DDA) com seleção síncrona de precursores e busca em tempo real (SPS-RTS), permitindo a detecção precisa e sensível dos peptídeos e suas modificações. Precursores com cargas de 2 a 5 foram selecionados para fragmentação, e até 10 fragmentos foram escolhidos para a etapa MS3. A busca foi realizada utilizando o banco de dados do proteoma de camundongo obtido do *Uniprot* em 24.06.2024. Este processo forneceu dados sobre a composição do proteoma de cada grupo permitindo a comparação entre eles.

Para as análises de bioinformática foram utilizados os valores de intensidade normalizados pela quantidade total de proteína e passaram por transformação utilizando o logaritmo na base 2 ($\log_2$). Em seguida, os peptídeos identificados foram agregados para integração dos dados ao nível de proteína através da função *aggregateFeatures* do pacote *QFeatures* (versão 1.14.2) (Gatto; Vanderaa, 2025). Posteriormente, a análise de abundância diferencial foi executada com uso do pacote

limma (versão 3.60.6) (Ritchie et al., 2015), estabelecendo-se os seguintes critérios para determinação de proteínas diferencialmente abundantes (DAP): $|\log_2 \text{Fold-change}| \geq 1$ e valor p-ajustado $< 0,05$. Com o intuito de identificar vias biológicas enriquecidas neste conjunto de dados, listas de genes foram geradas a partir do ranqueamento do $\log_2 \text{Fold-change}$ entre os grupos de interesse e submetidos à análise de enriquecimento de conjunto de genes (GSEA) usando as anotações relativas aos processos biológicos do banco de dados *Gene Ontology* (GO), por meio do pacote *clusterProfiler* (versão 4.12.6) (Wu et al., 2021). Todas as análises de bioinformática foram realizadas no ambiente estatístico R (versão 4.4.1) (R Core, 2024).

4.7 RT-PCR quantitativo (RT-qPCR)

As amostras teciduais (medula, córtex, hipocampo, estriado, cerebelo e baço) foram retiradas por microdissecção após a eutanásia. Em seguida, para isolar o RNA, as amostras foram colocadas em TRIzol. Após isolamento, o RNA foi ressuspendido em 20µL de água RNase free para avaliar sua concentração e qualidade por espectrofotômetro (*NanoDrop™ Thermo Scientific, Wilmington*). O cDNA foi obtido a partir da reação de transcriptase reversa, utilizando o RNA extraído previamente.

As sequências de iniciadores para os genes alvo (Tabela 1) foram obtidas e checadas através da ferramenta *Prime3Plus* e *Primer-BLAST* (NCBI). Foram desenhadas sequências iniciadoras específicas para os genes que expressam as proteínas BDNF, IL-1 β , I-6, TGF- β , MBP, C3, C4b, Serpina3n, H2-D1, B2M. A RT-qPCR foi realizada utilizando plataforma de PCR em tempo real (*QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real-Time PCR System*). Foram realizadas replicatas técnicas para as amostras e a partir dos resultados de RT-qPCR, as variações de expressão gênica foram normalizadas relativamente à expressão do normalizador RPL32 e calculadas por $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 4 – Sequência de iniciadores utilizados na técnica de RT-qPCR

	Senso	Anti-senso
<i>bdnf</i>	ATGAAAGAAGTAAACGTCCAC	CCAGCAGAAAGAGTAGAGGAG
<i>il-1β</i>	GGGCCTCAAAGGAAAGAATC	TACCAGTTGGGGAAGTCTGC
<i>tnf-α</i>	GCTGAGCTCAAACCCTGGTA	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
<i>tgf-β</i>	TCTGCCCCAAAGGAATTACC	CTCCATTGGGCTGAAAGGTG
<i>mbp</i>	TGGCTAAAGCAGAGCCGGA	GTGTTGAGGTGTCACAATGTT
<i>il-6</i>	ACGGCCTTCCCTACTTCACA	CATTTCCACGATTTCCAGAG
<i>h2-d1</i>	GCTCTCACACACTCCAGCAGAT	CCGTCCACGTTTTTCAGGTCTT
<i>b2m</i>	GACCGTCTACTGGGATCGAG	TTGCTATTTCTTTCTGCGTGC
<i>serpina3n</i>	GACCTGTCTGCAATCACAGGA	TTTGGGGTTGGCTATCTTGGC
<i>c3</i>	AAGCATCAACACACCCAACA	CTTGAGCTCCATTCGTGACA
<i>c4b</i>	AAA CAA CCA CAA CAT GCT GC	GTT CTC TGG GAA GGA GGT GC
<i>hprt</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
<i>rpl32</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG	TGACTGGTGCCTGATGAACT

4.8 Imunomarcação

Após a anestesia dos animais utilizados na terceira etapa, quatro animais de cada grupo foram destinados de forma randômica para as análises imunohistológicas. Os animais passaram por perfusão transcardíaca, utilizando 15 mL de Tampão fosfato-salino (PBS) 1x e 15 mL de paraformaldeído (PFA) 4%. Posteriormente, os cérebros e medulas foram dissecados, coletados e armazenados em PFA 4% por 24 horas e, após este período, mantidos em sacarose 30% à 4°C. Utilizando um aparelho Criostato, fatias coronais de 30 μ m foram feitas e armazenadas em solução crioprotetora. Ao seguir para as etapas de marcação do tecido, as fatias referentes à região de córtex pré-frontal ou corpo caloso foram selecionadas e seguiram para as etapas posteriores de imunomarcação, utilizando anticorpos específicos para os alvos de interesse.

4.8.1 Marcação de astrócitos

A quantificação de astrócitos foi feita através da marcação com anticorpo anti-S100 β (*Cell Signaling*), pela técnica de imuno-histoquímica. As fatias foram selecionadas e dispostas em placas de 24 poços. Em seguida, lavadas por 2 vezes de 5 minutos com PBS 1x e, logo após, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada usando peróxido de hidrogênio (0,3%). As fatias foram permeabilizadas durante 10 minutos

com Triton X-100 1%. Para bloquear reações inespecíficas, foi utilizado soro de cabra. Após este processo, as fatias foram incubadas com anticorpo primário de coelho anti-S100 β (1:1000), PBS1x, soro de cabra (2%) e albumina de soro bovino (BSA; 4%) overnight em temperatura de 4 °C. No dia seguinte, as fatias foram lavadas em PBS 1x e posteriormente incubadas em anticorpo secundário anti-coelho biotilado de cabra (diluição 1:400, coelho kit Elite vector ABC), durante 90 minutos à temperatura de 4°C. Após a incubação com anticorpo secundário, as fatias foram lavadas em PBS e incubadas com o complexo de reagente avidina-biotina (Vector Elite Kit) por 90 minutos a 4°C. Para visualização da imunocoloração, foi utilizado cromógeno (*Substrati Vector SG*). Finalizado o processo, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas e fixadas com Entellan (*Merck*) e lamínulas. O resultado da imunomarcação foi avaliado no microscópio EVOS FL (*Thermo Fisher Scientific*), em objetiva de 20x. Foram retiradas 4 fotos de córtex pré-frontal por fatia. A quantificação das fotos foi realizada de forma cega e utilizando o software *Image J* (NIH, EUA, RRID: nif-0000-30467).

4.8.2 Marcação de desmielinização

A quantificação da desmielinização foi realizada através de imunofluorescência, utilizando um anticorpo anti-MBP (Abcam) (proteína básica de mielina). Após selecionar as fatias contendo o córtex pré-frontal, as mesmas foram lavadas com Solução Salina Tamponada com Tris (TBS) por 3 vezes de 30 minutos cada. Para realizar reexposição antigênica, foram colocadas em tampão citrato 1x a 70°C por 30 minutos e, após este tempo, lavadas com TBS, por 3 vezes de 10 minutos cada. O bloqueio foi realizado utilizando BSA 4%, Triton x100 0,5%, diluídos em TBS. As fatias foram incubadas nesta solução por 2 h, em temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu a incubação com anticorpo primário anti-MBP (1:100) anti-rato overnight a 4°C. No dia seguinte, as fatias foram lavadas com TBS 1x e incubadas em anticorpo secundário conjugado com fluoróforo (Alexa flúor IgG anti-rato 546 (Invitrogen)) em solução de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as fatias passaram por 6 lavagens de 10 minutos com TBS 1x. Após posicionar as fatias em lâminas gelatinizadas, as lâminas foram montadas com auxílio de Fluoromount e cobertas com lamínulas. Com auxílio do microscópio confocal LSM 880 (ZEISS), foram obtidas fotos no aumento de 20x de córtex pré frontal. Utilizando o software

Image Pro-Plus, as imagens foram processadas e as áreas desmielinizadas avaliadas manualmente e calculadas pelo próprio software (Gardner et al., 2013).

4.8.3 Marcação de micróglias

4.8.3.1 Imunohistoquímica para Iba-1

A marcação realizada através da técnica de imuno-histoquímica utilizou anticorpo anti-Iba1 (*Thermo Fisher*) (1:1000.) O protocolo utilizado e análise dos dados seguiram os mesmos passos utilizados para avaliação de astrócitos (S100 β), diferindo apenas quanto ao anticorpo utilizado.

4.8.3.2 Imunofluorescência para Iba-1 e CD68

A fim de obter as marcações de micróglia e sua ativação, utilizamos anticorpos Iba-1 e CD68 pela a técnica de imunofluorescência. As fatias foram lavadas 3 vezes de 30 minutos com TBST (TBS contendo 0.5% Triton X-100; 300 μ L/poço) em uma placa de 24 poços contendo 2 fatias por poço. Após as lavagens, as fatias foram incubadas em tampão citrato por 30 minutos (300 μ L/poço) a 70 °C. Em seguida foram lavadas por 3 vezes de 10 minutos com TBST (300 μ L/poço). Em seguida, realizou-se o bloqueio por 120 min em 4% BSA em TBST (300 μ L/poço). As fatias foram incubadas com os anticorpos primários de rato anti- CD68 Biorad MCA 1957 lote nº 1602 IgG2a (1:1000) e coelho anti-Iba1 anticorpo policlonal 21274 IgG (1:1000) em solução de bloqueio por 48 horas a 4°C, 200 μ L/poço. As seções foram lavadas 3 vezes por 10 minutos em TBST e então incubadas com anticorpo de cabra anti-rato conjugado com Alexa Fluor 546 (1:1000), anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500) e DAPI (1:500) por 1 hora à temperatura ambiente, 200 μ L/poço. Por fim, as seções foram lavadas 3 vezes com TBST 300 μ L/poço por 20 minutos cada lavagem e montadas em lâminas para serem visualizadas em um sistema confocal SPINNING DISK YOKOGAWA – 3i. As imagens foram processadas e analisadas utilizando o software *Image J* (NIH, EUA, RRID: nif-0000-30467). Análises morfológicas também foram realizadas a partir destas imagens, através do plugin *MicrogliaMorphology* do software *Image J* (Kim; Pavlidis; Ciernia, 2024).

Após o processamento das imagens e obtenção dos resultados, utilizamos as micróglias encontradas como unidade amostral. Para investigar se o tratamento com VU0409551 altera os perfis de ativação microglial em animais EAE, realizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA), incluindo as seguintes variáveis por micróglia: área, intensidade de IBA1, intensidade de CD68, número de puncta CD68 e a pontuação clínica do animal ao qual as micróglias pertenciam. Os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) foram utilizados para visualização de possíveis agrupamentos e tendências associadas aos diferentes tratamentos. Além dos dados de ativação microglial, adotamos os mesmos procedimentos analíticos para a caracterização morfológica das micróglias. Para isso, realizamos uma segunda PCA incluindo as seguintes variáveis morfológicas por micróglias: área, número e comprimento de ramos, além da pontuação clínica.

4.9 Análises estatísticas

Os dados de pontuação clínica, porcentagem de peso, RT-qPCR, Imunohistoquímica, Imunofluorescência, testes comportamentais, citometrias de fluxo e ELISAs foram avaliados por ANOVA de duas vias e seguidos de pós-teste para múltiplas comparações de *Tukey's*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados serão apresentados em média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Estas análises estatísticas foram feitas utilizando o software *Graph Pad PRISM* (versão 8.0.1 *Graph Pad Software Inc.*). Para avaliar se o número de micróglias variava em função da pontuação clínica e/ou tratamento com VU0409551, ajustamos modelos de regressão lineares simples (LM). Nesses modelos, utilizamos o número de micróglias como variável resposta e pontuação clínica, o tratamento e sua interação como efeitos fixos. Nesta abordagem, os animais foram considerados como réplicas nos modelos. Quando identificados efeitos significativos do tratamento e/ou pontuação clínica no número de micróglias, testado através de um ANOVA no modelo ajustado (pacote:car) (Fox; Weisberg, 2019), realizamos análises de contrastes pós-teste (pacote: emmean) (Lenth, 2025) para comparações pares a par entre os tratamentos. Estas análises descritas foram realizadas em ambiente estatístico R (versão 4.4.1) (R Core, 2024).

5 RESULTADOS

5.1 O tratamento com VU0409551 diminui a pontuação clínica de fêmeas EAE

Não existem estudos avaliando MAPs de mGluR5 na EM. Sendo assim, a padronização do regime de tratamento em relação ao dia de início da administração do VU0409551 e a dose a ser utilizada aconteceram em diversas etapas, tendo como base estudos de perfil farmacológico (Rook et al., 2015) e tratamento em outros tipos de doenças neurodegenerativas (Conde-Ceide et al., 2015; Doria et al., 2018a). Para determinar um possível efeito deste modulador, utilizamos animais machos ou fêmeas, doses e momentos de início de tratamento diferentes, que serão descritos em cada etapa de padronização.

5.1.1 Primeira etapa de padronização do modelo EAE e do tratamento com VU0409551

Os animais (machos) receberam injeções intraperitoneais diárias, iniciando cinco dias após a indução (dpi) e terminando no dia 19 dpi, totalizando 15 dias de tratamento. A eutanásia aconteceu no dia 28 dpi. As especificações do desenho experimental estão contidas na Figura 6.

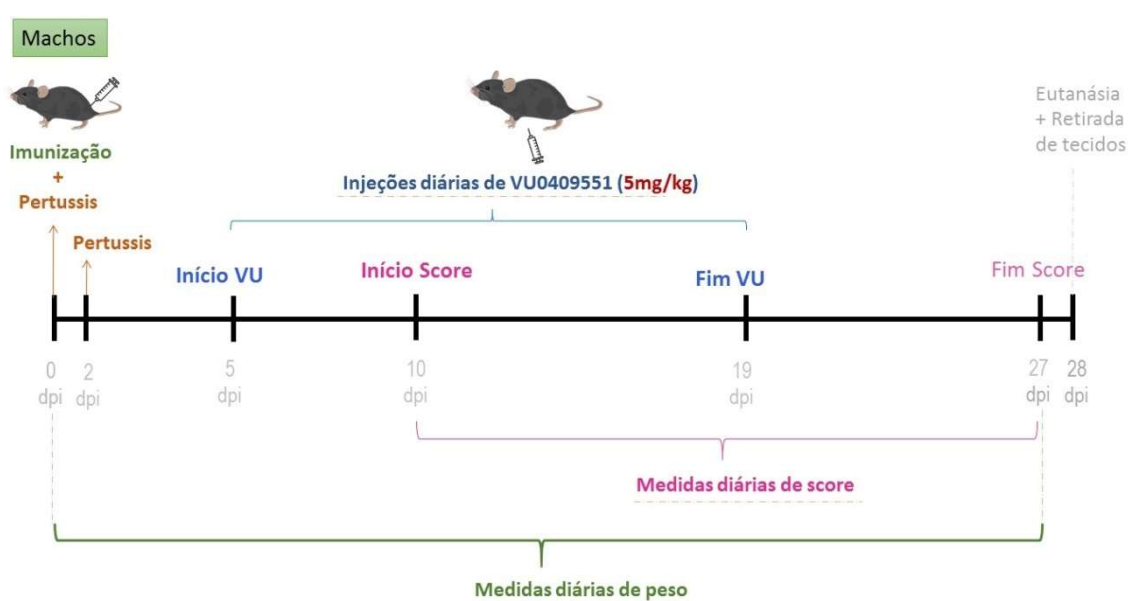


Figura 6 - Cronologia experimental da primeira etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.

O grupo EAE Veículo apresentou piora clínica a partir do dia 10, chegando no pico dos sintomas nos dias 16-18 dpi. A partir do dia 20 dpi houve uma melhora parcial dos parâmetros clínicos destes animais. Um ponto relevante é que este grupo não chegou a pontuações clínicas maiores, como 3 ou 4, como era o esperado para o modelo, sugerindo que a imunização não teria sido completa nessa primeira tentativa de padronização (Figura 7). Foi possível observar que o grupo EAE VU apresentou uma melhora do score clínico, com diminuição da pontuação clínica quando comparado ao EAE Veículo (Figura 7). Contudo, cinco dias após o término do tratamento, os animais passaram a apresentar piora na pontuação clínica. Este acontecimento indica a capacidade do VU0409551 em melhorar os sintomas clínicos, porém, esse efeito benéfico não prevalece se o tratamento for descontinuado.

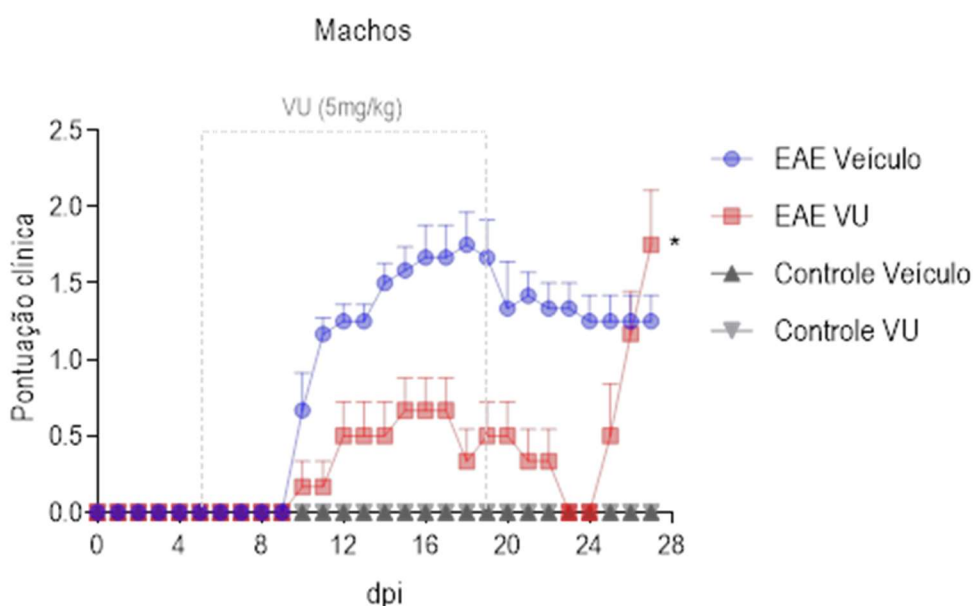


Figura 7 – O tratamento com VU0409551 diminuiu a pontuação clínica de animais EAE, mas este efeito não permaneceu após o término do tratamento. O gráfico mostra a pontuação clínica (média $\pm$ SEM) de animais (machos) controle (n=4) e EAE (n=6), que foram tratados com veículo (β -ciclodextrina- 20%) ou VU (5 mg/kg) ao longo de 15 dias. *indica $p < 0.05$ para pós teste de Tukey comparando grupo EAE-Veículo e EAE-VU.

5.1.2 Segunda etapa de padronização

Levando-se em conta as observações da etapa anterior, foram implementadas algumas mudanças no protocolo. Foram utilizadas fêmeas C57BL/6 de oito semanas de idade para prosseguir com os testes de padronização, uma vez que os dados da

literatura indicam que fêmeas seriam mais suscetíveis à indução de EAE (Bjelobaba et al., 2018b; Kipp et al., 2017). Além disso, como a EM é mais prevalente entre mulheres, avaliamos que a utilização de fêmeas teria maior relevância clínica.

As concentrações de MOG35-55 e VU0409551 permaneceram iguais à etapa de padronização do modelo EAE e tratamento com VU0409551. Porém, os resultados da etapa anterior sugeriram que o início do tratamento com VU0409551 foi precoce, indicando uma indução inadequada. Portanto, uma vez que o objetivo principal deste estudo é averiguar se o tratamento poderia melhorar os déficits envolvendo o SNC exibidos por animais EAE, decidimos por iniciar o tratamento com VU0409551 após o modelo EAE já ter se estabelecido. Desta forma, os animais receberam injeções intraperitoneais diárias, iniciando no dia 10 ou 14 dpi e terminando no dia 22 dpi, totalizando 13 ou 9 dias de tratamento, respectivamente. Os animais foram eutanasiados no dia 23 dpi (Figura 8).

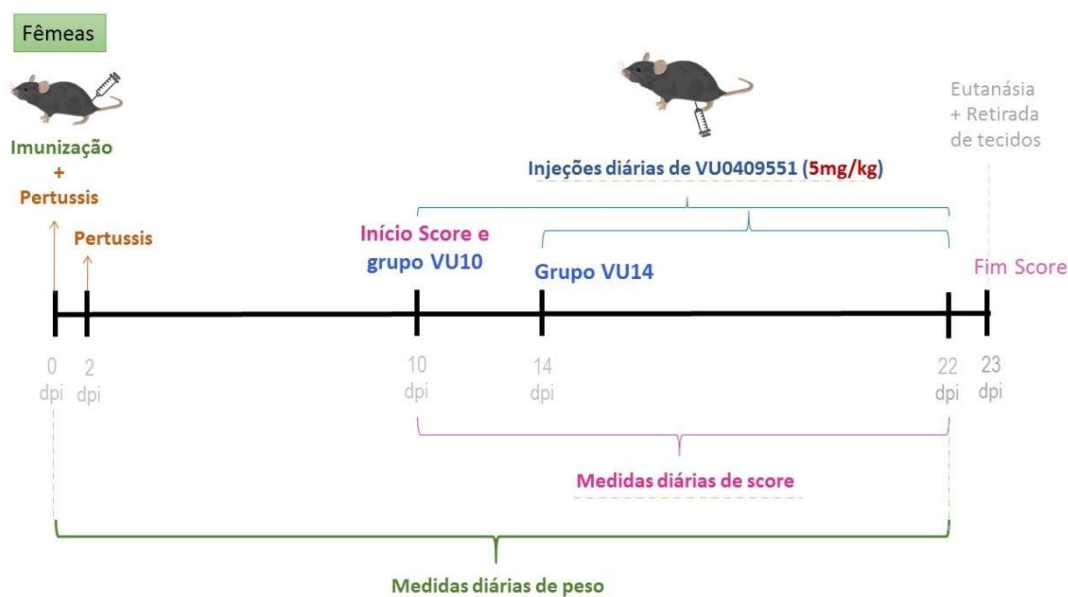


Figura 8 - Cronologia experimental da segunda etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.

Essa segunda etapa, os animais EAE também não desenvolveram a pontuação clínica completa, sugerindo novamente que a imunização não teria sido eficiente. Ademais, os grupos EAE que foram tratados com VU0409551 (5mg/kg) não tiveram redução dos sinais clínicos (Figura 9) quando comparados ao grupo EAE Veículo. Já se sabe que em animais existe uma diferença no perfil farmacológico de mGluR5 que é dependente do sexo (Abd-Elrahman et al., 2020; Chiang; Park, 2020; McCombe;

Greer, 2022; Tonn Eisinger et al., 2018). Além disso, as mudanças de perfil hormonal entre os sexos podem influenciar na resposta a diversos tipos de drogas (Ghareghani et al., 2021). Pensando nisso, a próxima etapa foi realizada utilizando-se uma dose maior (10mg/kg) de VU0409551.

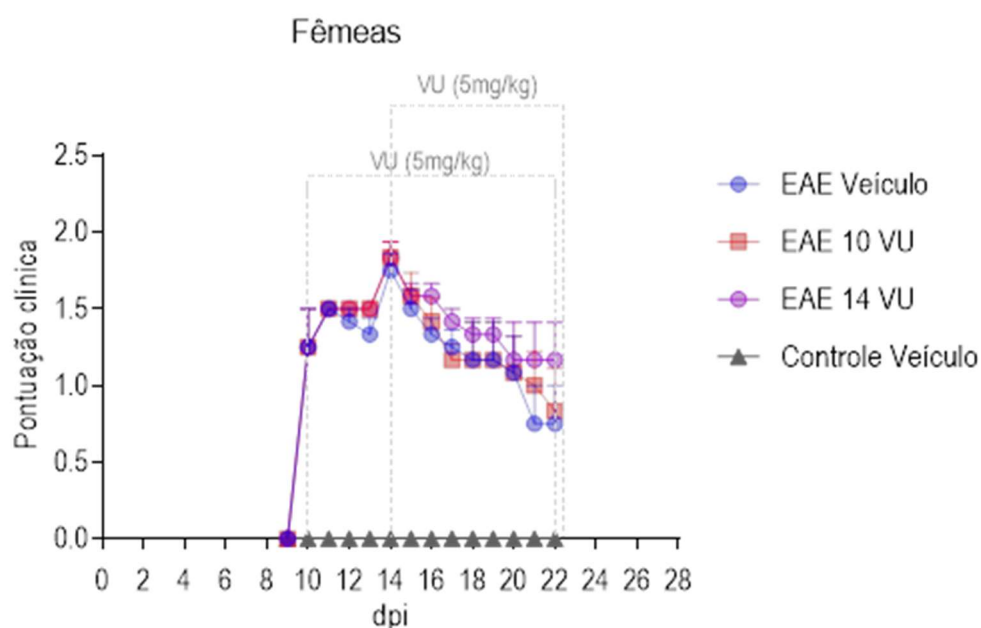


Figura 9 - O tratamento com VU0409551, iniciando no dia 10 ou 14 dpi, não altera a pontuação clínica de animais EAE. O gráfico mostra a pontuação clínica (média ± SEM) de animais (fêmeas) controle (n=4) e EAE (n=6), que foram tratados com veículo (β -ciclodextrina- 20%) ou VU (5 mg/kg). O grupo EAE10VU e EAEVU14 iniciaram o tratamento com VU0409551 no 10 dpi e 14 dpi e o tratamento foi mantido por 13 e 9 dias, respectivamente. Foi realizado ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey para múltiplas comparações.

5.1.3 Terceira etapa de padronização

A partir das observações da etapa anterior, outras mudanças foram estabelecidas. O volume de MOG foi aumentado para 150 μ g/100 μ l como estratégia para otimização da indução do modelo, que apresentava eficácia reduzida. O tratamento com VU0409551 ocorreu utilizando uma dose de 10 mg/kg, já que as doses utilizadas no experimento anterior não se mostraram efetivas. Os animais receberam injeções intraperitoneais diárias, iniciando dez dias após a indução (10 dpi) e terminando no dia 27 dpi, totalizando 18 dias de tratamento (Figura 10).

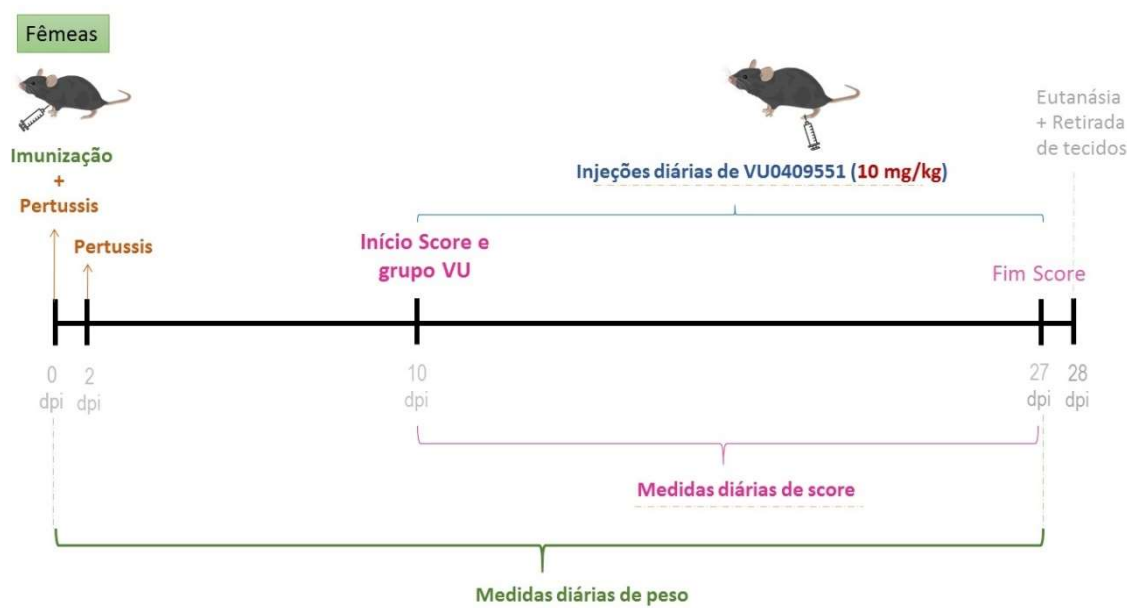


Figura 10 - Cronologia experimental da terceira etapa de padronização do modelo e tratamento com VU0409551.

O grupo EAE Veículo apresentou fenótipo típico do modelo EAE, com aparecimento dos primeiros sintomas por volta do dia 10 dpi, seguido de aumento dos sinais clínicos, até chegar no pico nos dias 16-17 dpi. Após o dia 20 dpi ocorreu melhora parcial dos sinais clínicos, como esperado. O grupo EAE Veículo apresentou pontuação clínica maior em relação ao grupo controle. Além disso, observou-se uma reversão parcial da pontuação clínica quando animais EAE foram tratados com VU0409551. Especificamente para o grupo EAE VU, além das diferenças em relação ao EAE Veículo, este grupo apresentou score clínico maior, estatisticamente, também em relação aos Controle Veículo e Controle VU (Figura 11 – A). A perda de peso que acompanha a evolução do modelo EAE também foi revertida devido ao tratamento com VU0409551 (Pós-teste de *Tukey*) (Figura 1 - B).

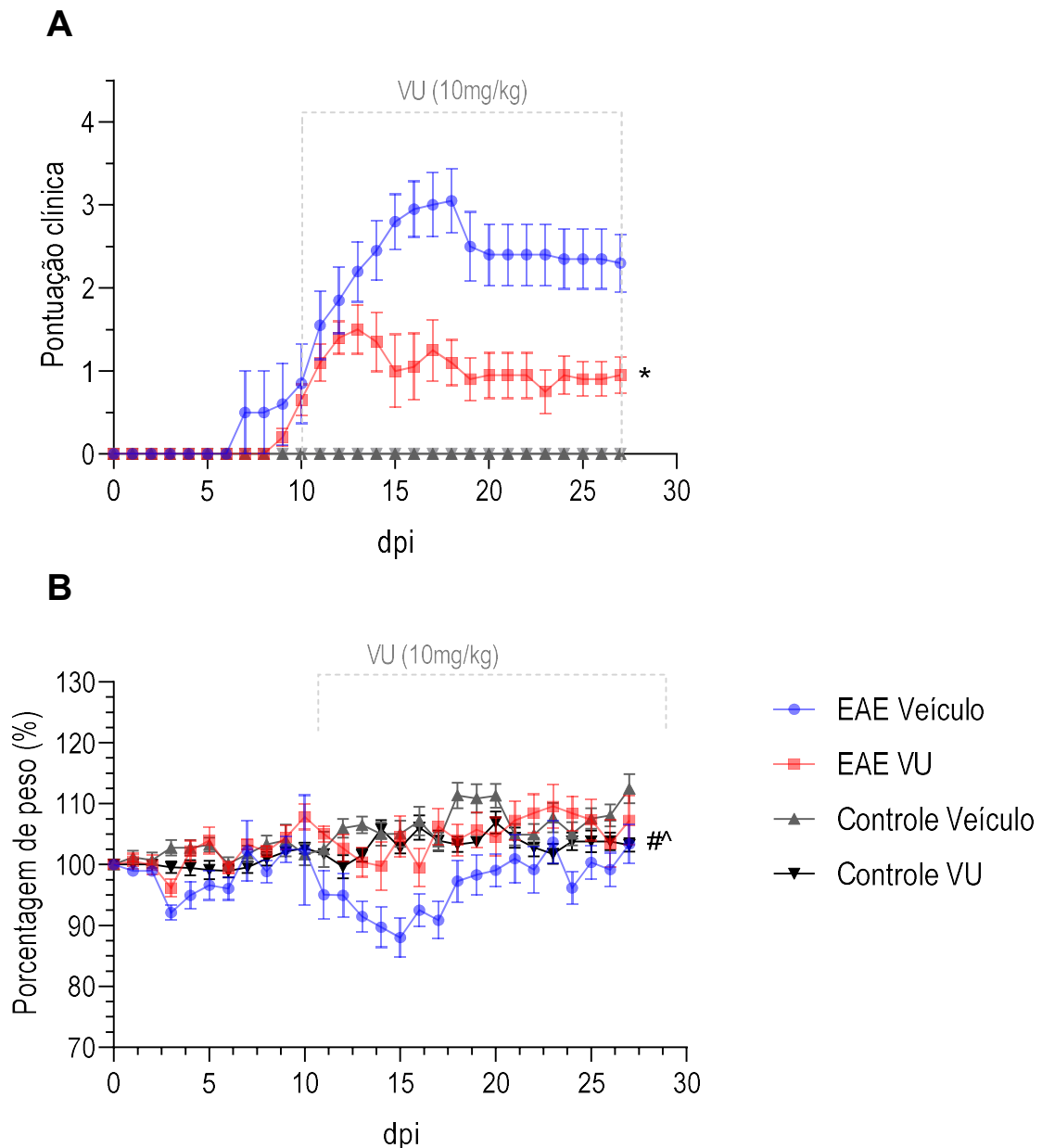


Figura 11 – O tratamento com VU0409551 diminuiu a pontuação clínica de animais EAE e impediu a perda de peso destes animais. Os gráficos mostram a pontuação clínica (A) e a porcentagem de peso (B) de animais (fêmeas) controle e EAE, que foram tratados com veículo (β -ciclodextrina- 20%) ou VU (10 mg/kg), iniciando no dia 10 dpi e sendo mantido diariamente ao longo de 18 dias. Os dados representam a média $\pm$ SEM. Foi realizado ANOVA de duas vias e pós-teste de Tukey para múltiplas comparações (# indica pós teste significativo quando comparado EAE VU e EAE Veículo; ^ indica comparação significativa entre grupo EAE VU e Controle VU; * indica diferença entre p grupo EAE Veículo e EAE VU).

5.2 O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos do tipo ansioso e depressivo no modelo EAE

A prevalência de ansiedade e depressão em pessoas com EM é alta, atingindo cerca de 20-54% e 25-65%, respectivamente. Além disso, a ansiedade e depressão são consideradas as comorbidades neuropsiquiátricas mais comuns nestes pacientes (Jellinger, 2024a). No modelo EAE, sintomas semelhantes à ansiedade e depressão podem surgir desde as fases iniciais e seguir até as fases de remissão e crônicas (Grace et al., 2017; Weerasinghe-Mudiyanselage et al., 2024) Por isso, decidimos avaliar se o tratamento de animais EAE interfere em comportamentos do tipo ansioso e depressivo e, para isso, realizamos testes comportamentais que avaliam estes dois comportamentos. Os testes foram realizados em dois períodos de desenvolvimento do modelo EAE: 1) a fase pré clínica (5-9 dpi), onde os animais passaram pela indução do modelo, mas ainda não desenvolveram sintomas clínicos, e 2) fase da remissão (24-28 dpi), onde os animais já apresentaram o pico dos sintomas clínicos (16 dpi) e estão se recuperando (Figura 12). Esta abordagem permitiu uma avaliação mais detalhada da função do tratamento em estágios diferentes da doença.

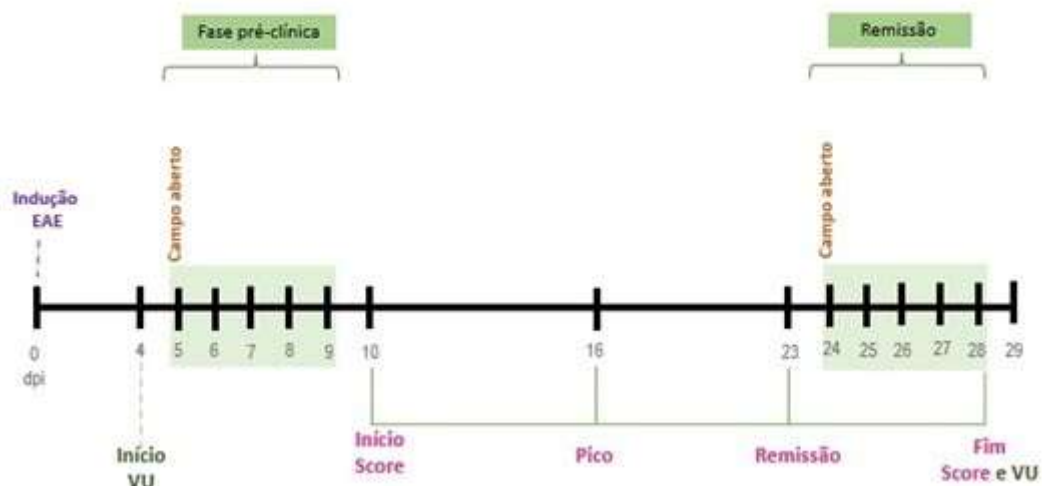
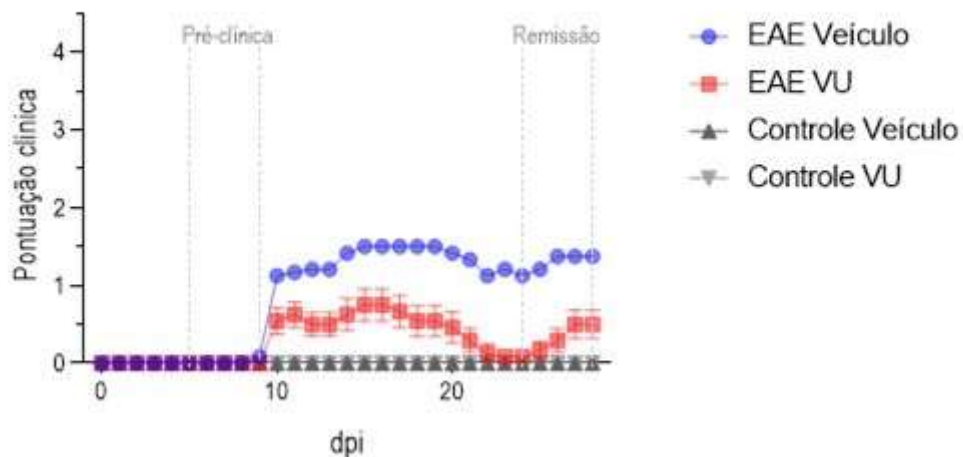
A**B**

Figura 12 - Esquema experimental de testes comportamentais e pontuação clínica. (A) Linha do tempo experimental representando os períodos de indução da EAE, início do tratamento com VU0409551, pico da doença e remissão. Os testes comportamentais foram realizados em dois momentos principais: fase pré-clínica (dias 5-9 pós-indução) e fase de remissão (dias 24-28 pós-indução). Os testes incluíram Campo Aberto, Splash, Claro-Escuro, Labirinto em Cruz Elevado e Suspensão da Cauda (B) Pontuação clínica dos grupos experimentais ao longo dos dias pós-indução (dpi).

5.2.1 Animais EAE tem locomoção reduzida na fase pré-clínica

Os testes comportamentais aconteceram na fase pré-clínica e de remissão do modelo (Figura 13 – A). A apresentação clínica dos animais EAE não atingiu pontuações mais altas (2 a 4,5), ficando, em média, 1,5 pontos no pico (16 dpi) dos sintomas. Entretanto, houve diferença entre os grupos EAE veículo e controle, bem

como entre os grupos EAE veículo e EAE VU, demonstrando que houve indução da EAE e que o tratamento com VU0409551 foi eficaz (Figura 13 – B).

Para avaliar o comportamento locomotor e exploratório dos animais, realizamos teste de campo aberto. Neste teste, cada animal foi colocado no aparato e permitiu-se sua livre exploração por 30 minutos. A indução da EAE causou diminuição na distância percorrida e na velocidade de locomoção, mas o tratamento com VU0409551 não alterou este padrão (Figura 14 – B e D). Além disso, o número de saídas da periferia foi menor no grupo EAE, independentemente do tratamento com VU0409551 (Figura 14 – C).

Esses resultados indicam que os animais que passaram pelo processo de indução do modelo EAE já tem prejuízos antes mesmo da apresentação dos sintomas clássicos e que isso reflete na capacidade locomotora dos animais. Porém, o tratamento com VU0409551 não altera esse desfecho. Não foram observadas diferenças entre os grupos com relação ao tempo na periferia e à porcentagem de distância percorrida no centro e na periferia (Figura 14 – E-G). Na fase de remissão, nenhum dos parâmetros avaliados apresentou alterações significativas entre os grupos (Figura 15 – B-G). Isso indica que as alterações observadas na fase pré-clínica não se mantêm na fase de remissão, o que é esperado, já que os animais já estão se recuperando.

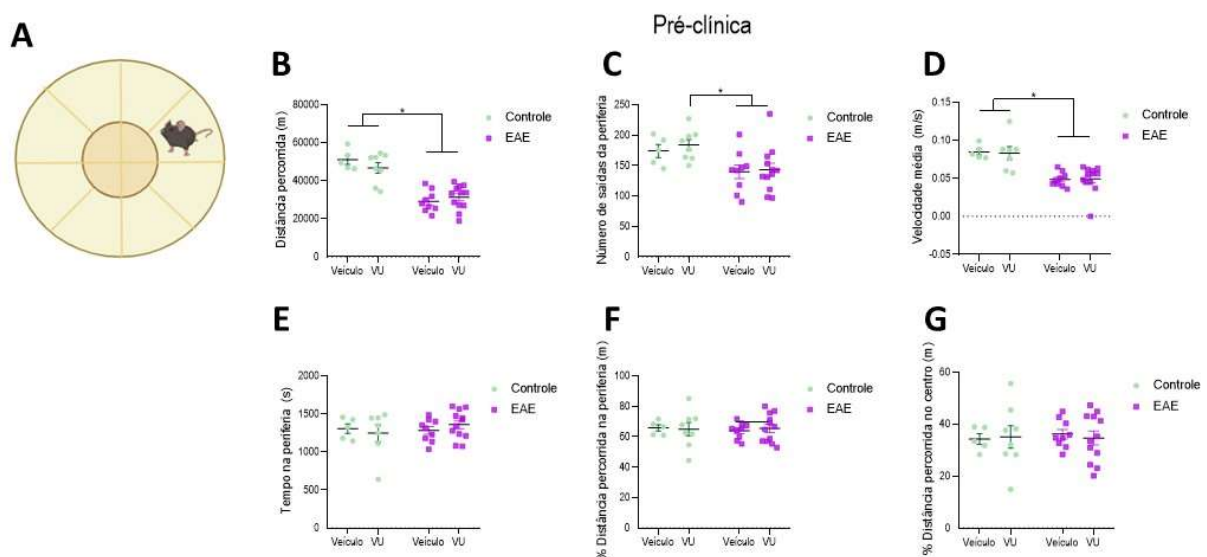


Figura 13- Animais EAE, tratados ou não com VU0409551, apresentam locomoção reduzida na fase pré-clínica. (A) Esquema do aparato do campo aberto. (B) Distância total percorrida. (C) Número de saídas da periferia. (D) Velocidade média. (E) Tempo na periferia. (F) Porcentagem da distância

percorrida na periferia. (G) Porcentagem da distância percorrida no centro. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística encontrada pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

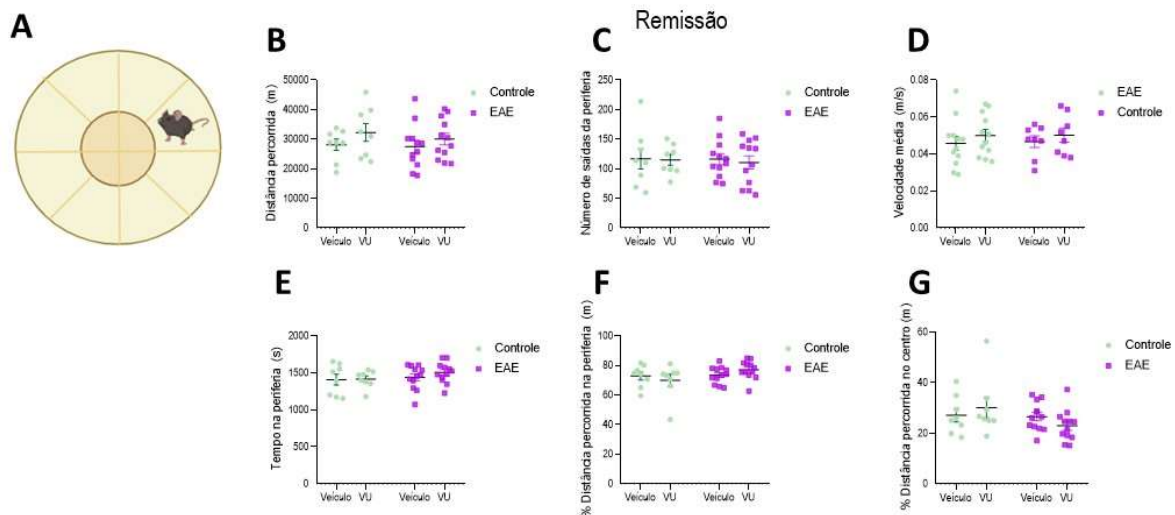


Figura 14 – O tratamento com VU0409551 não altera parâmetros locomotores e do tipo ansiosos em animais EAE na fase de remissão do modelo. (A) Esquema do aparato do campo aberto. (B) Distância total percorrida. (C) Número de saídas da periferia. (D) Velocidade média. (E) Tempo na periferia. (F) Porcentagem da distância percorrida na periferia. (G) Porcentagem da distância percorrida no centro. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística encontrada pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.2.2 O uso de VU0409551 em animais EAE pode ter um efeito motivacional independente da presença de comportamentos do tipo depressivo.

Os testes utilizados para avaliar comportamentos semelhantes aos depressivos foram o teste de suspensão pela cauda e o teste de splash. O teste de suspensão pela cauda analisa o comportamento de desespero e desamparo. Nesse teste, o tempo de imobilidade dos animais é registrado como um indicativo de desespero comportamental, enquanto uma redução nesse tempo reflete um efeito terapêutico (Bouguiyoud et al., 2022). Já o teste de splash avalia o comportamento de autocuidado e motivação. Nesse teste, os animais são borrifados com uma solução açucarada, e o tempo dedicado ao comportamento de limpeza (grooming) é medido (Bouguiyoud et al., 2022; Savall et al., 2025). Uma diminuição nesse comportamento é interpretada como um sinal de apatia, enquanto um aumento sugere melhora nos sintomas

depressivos. No teste de suspensão pela cauda, animais EAE tratados apenas com Veículo não apresentaram diferenças no tempo de imobilidade e latência para imobilidade, quando comparado ao grupo controle, sugerindo que este teste não foi capaz de detectar comportamento do tipo depressivo nos animais EAE. Porém, o tratamento com VU0409551 em animais EAE aumentou a latência para imobilidade na fase pré-clínica e de remissão (Figura 17 - B-D).

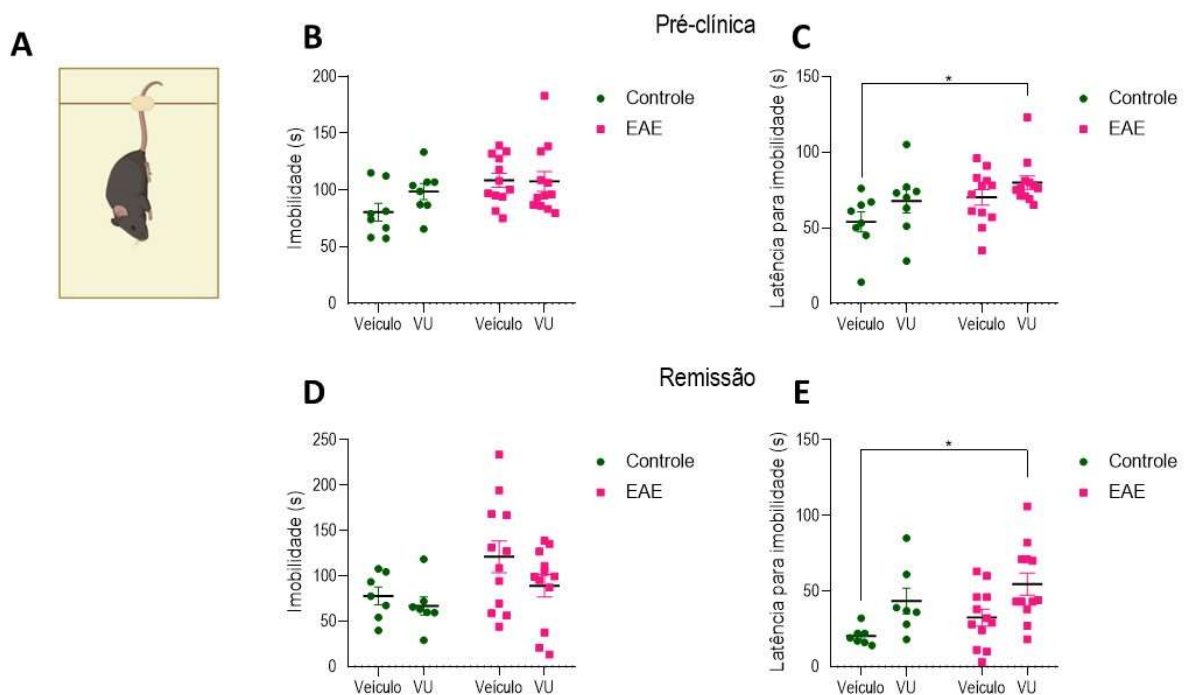


Figura 15 – Animais EAE não apresentam comportamentos semelhantes a depressão no teste de suspensão da cauda. (A) Ilustração do teste de suspensão pela cauda. (B) Tempo de imobilidade na fase pré-clínica. (C) Latência para imobilidade na fase pré-clínica. (D) Tempo de imobilidade na fase de remissão. (E) Latência para imobilidade na fase de remissão. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística encontrada pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

No teste de splash, na fase pré-clínica, não houve diferença entre os grupos controle e o EAE Veículo, indicando uma ausência de comportamentos semelhantes aos depressivos. Porém, o tratamento com VU0409551 em animais EAE aumentou o tempo de grooming (autocuidado), independentemente da existência de déficits detectáveis por este teste no grupo EAE (Figura 18 – B e C). Na fase de remissão, novamente, não foi observado comportamento do tipo depressivo em animais EAE no teste utilizado. Animais EAE tratados com VU0409551 tiveram uma diminuição no tempo de grooming quando comparado aos grupos controle e EAE veículo (Figura 18

– D). Essa observação entra em conflito com a anterior, da fase pré-clínica, onde o tratamento com VU0409551 aumentou o tempo de grooming em animais EAE. Estes dados sugerem que o papel de VU0409551 com relação a comportamentos do tipo depressivo pode ser dependente do contexto fisiopatológico, ou seja, das fases pré-clínica e de remissão do modelo EAE. A latência para início do grooming não foi alterada pelas condições avaliadas na fase pré-clínica e de remissão (Figura 18 – C e E).

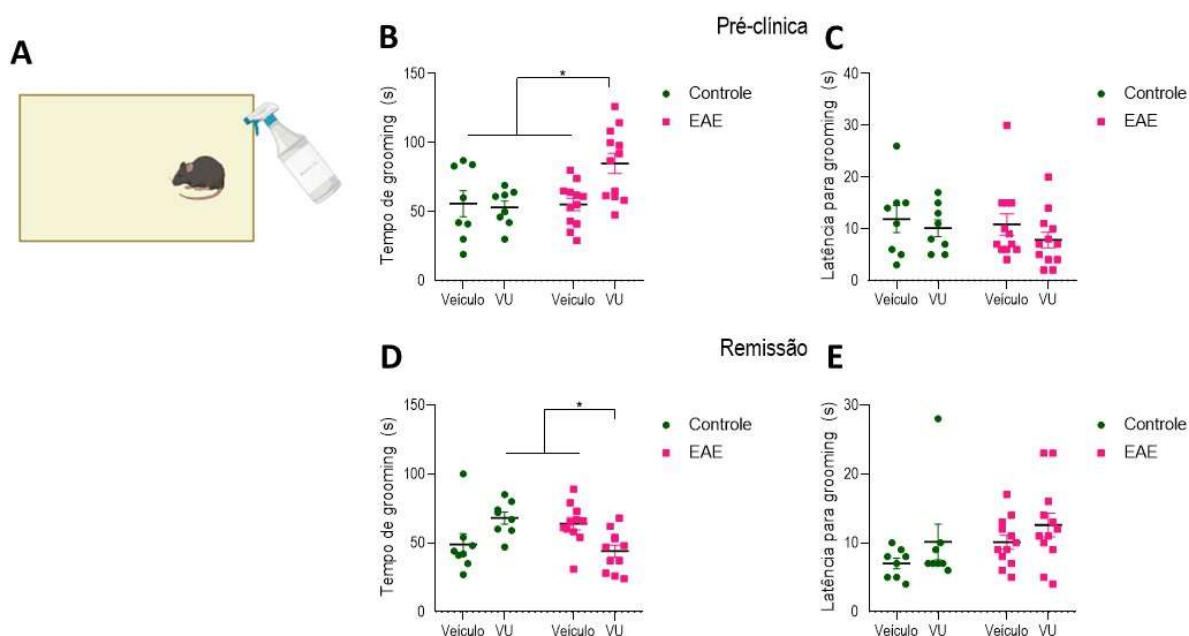


Figura 16 – O tratamento com VU0409551 em animais EAE altera comportamentos de autocuidado de forma dependente da fase do modelo. (A) Ilustração do teste splash. (B) Tempo de grooming na fase pré-clínica. (C) Latência para grooming na fase pré-clínica. (D) Tempo de grooming na fase de remissão. (E) Latência para grooming na fase de remissão. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística encontrada pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.2.3 O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade em animais EAE.

Para avaliar os comportamentos semelhantes à ansiedade, foram utilizados os testes Claro-Escuro e Labirinto em Cruz Elevado. No teste Claro-escuro os animais foram colocados no aparato e puderam explorar livremente uma caixa com dois compartimentos, um menor e totalmente escuro e o outro maior e com iluminação direta. Um indicativo de aumento de ansiedade é a exploração por um tempo menor

da caixa clara (Bourin; Hascoët, 2003). O aparato do labirinto em cruz elevado consiste em uma estrutura elevada, com dois braços abertos e dois braços fechados, dispostos perpendicularmente, formando uma cruz. Um comportamento semelhante à ansiedade é caracterizado pela menor permanência do animal nos braços abertos (Kraeuter; Guest; Sarnyai, 2019). Os testes aconteceram na fase pré-clínica e de remissão do modelo (Figura 13 – A). Na fase pré-clínica, o número de entradas dos animais EAE no campo claro foi menor, quando comparado aos controles. Animais EAE tratados com VU0409551 também tiveram queda no número de entradas no campo claro comparado aos controles (Figura 19 – B). O tempo no campo claro foi menor no caso de animais EAE que são tratados apenas com Veículo, mas em animais tratados com VU0409551 esse padrão é revertido parcialmente (Figura 19 – C). Este achado sugere que o VU0409551 possa ter um efeito sobre este tipo de comportamento semelhante à ansiedade apresentado pelos animais EAE. Na fase de remissão, animais EAE tratados apenas com Veículo apresentaram diminuição no número de entradas no campo claro, quando comparados ao grupo Controle VU, sugerindo novamente que a EAE induz comportamento do tipo ansioso. Entretanto, o tratamento do grupo EAE com VU0409551 reverteu esse fenótipo, uma vez que levou a um aumento significativo do número de entradas no campo claro, quando comparado ao grupo EAE veículo (Figura 19 – D). Esses resultados corroboram a hipótese de que o tratamento com VU0409551 possa ter um efeito ansiolítico. Nesta fase da remissão, o tempo no campo claro não foi diferente entre os grupos (Figura 19 – E).

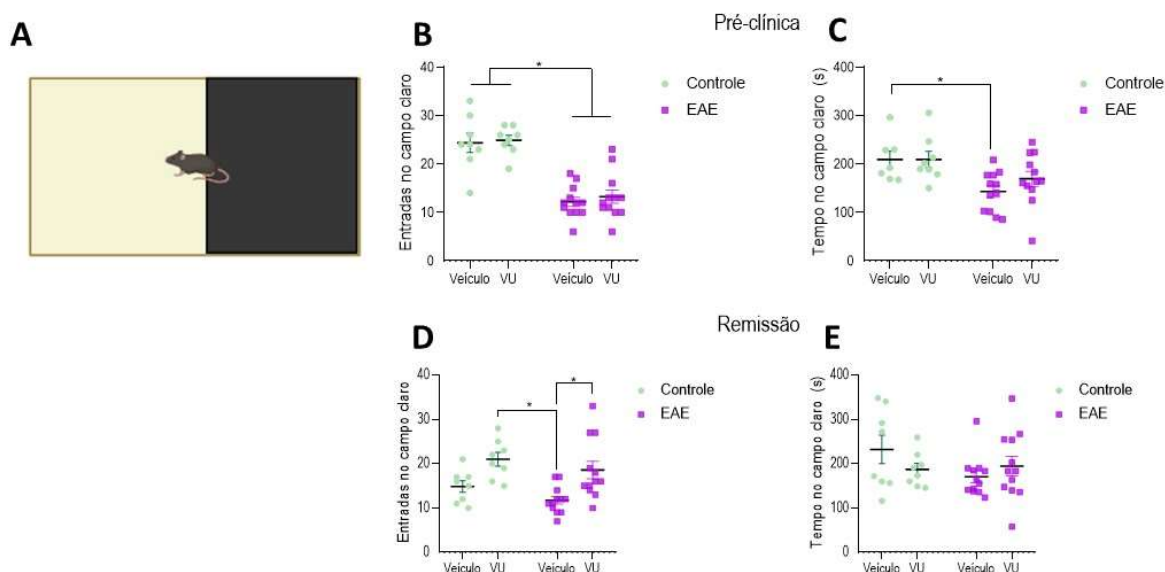


Figura 17 – O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade no teste Claro-escuro. (A) Ilustração do aparato do campo claro-escuro. (B) Número de entradas no campo claro na fase pré-clínica. (C) Tempo no campo claro na fase pré-clínica. (D) Número de entradas no campo claro na fase de remissão. (E) Tempo no campo claro na fase de remissão. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

No teste de Labirinto em Cruz Elevado, na fase pré-clínica, o tempo, latência e número de entradas no braço aberto não foram alterados em nenhuma das condições (Figura 20 – B, C e D). Na fase de remissão, o tempo no braço aberto não foi diferente entre os grupos controle e EAE. Porém, animais que receberam o tratamento com VU0409551 apresentam maior tempo no braço aberto, quando comparado aos animais EAE que receberam apenas Veículo (Figura 20 – E). A latência para entrada no braço aberto não foi alterada no grupo EAE Veículo, quando comparada aos grupos controles. Porém, foi menor no grupo EAE VU quando comparada aos grupos Controles (Figura 20 – F). O número de entradas no braço aberto de animais EAE foi menor, comparado ao grupo Controle que recebeu VU0409551, sugerindo que o modelo EAE induziu comportamentos semelhantes à ansiedade. Além disso, o número de entradas no braço aberto foi aumentado em animais EAE que receberam tratamento com VU0409551 (Figura 20 – G). Assim, esses dados também sugerem que o tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade na remissão do modelo.

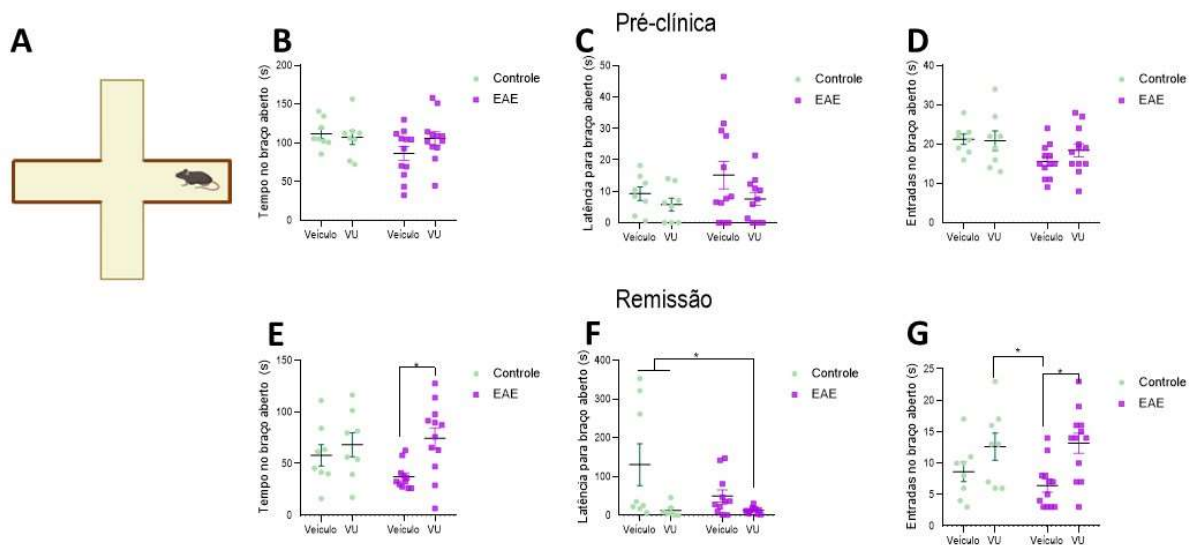


Figura 18 – O tratamento com VU0409551 diminui comportamentos semelhantes à ansiedade no teste de Labirinto em Cruz Elevado. (A) Ilustração do aparato do labirinto em cruz elevado. (B) Tempo nos braços abertos na fase pré-clínica. (C) Latência para entrar nos braços abertos na fase pré-clínica. (D) Número de entradas nos braços abertos na fase pré-clínica. (E) Tempo nos braços abertos na fase de remissão. (F) Latência para entrar nos braços abertos na fase de remissão. (G) Número de entradas nos braços abertos na fase de remissão. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.3 O tratamento com VU0409551 normaliza o aumento dos níveis de IL-17 observados no baço de animais EAE.

Embora a patologia da EAE/EM se manifeste no SNC, a ativação inicial de células imunes ocorre predominantemente na periferia (Caravagna et al., 2018; O'connor et al., 2008). Além disso, a maioria das terapias aprovadas para EM atua na periferia, bloqueando a migração de células imunes para o SNC (ex.: natalizumabe) ou modulando sua ativação (ex.: fingolimode) (Francis et al., 2014; Koudriavtseva et al., 2014; Kowarik et al., 2021; Schneider-Hohendorf et al., 2014). Como não se sabe qual mecanismo de ação do VU seria importante para o seu efeito sobre animais EAE, avaliamos parâmetros chaves da ativação periférica. O baço é um órgão central na regulação da imunidade sistêmica, já que pode filtrar antígenos, regular imunidade inata e adaptativa e, em modelos animais de autoimunidade como a EAE, pode ser local crítico para o equilíbrio entre respostas inflamatórias e regulatórias (Bronte; Pittet, 2013; Yu et al., 2021). No modelo EAE, o aumento das populações Th1 e Th17 no baço é um marcador importante da progressão da doença (El-Behi; Rostami; Ciric,

2010; Kang et al., 2017). Desta forma, utilizamos este tecido para avaliar a expressão de citocinas importantes no contexto da EAE e avaliar as subpopulações celulares Th1 e Th17. A partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos obtidos do baço de camundongos controle e EAE, tratados ou não com VU0409551, foi realizado um ensaio de ELISA para quantificação da expressão das citocinas IFN- γ e IL-17 (Figura 21 – A). Como controle positivo, as culturas de esplenócitos foram estimuladas com PMA + Ionomicina e, como controle negativo, apenas meio de cultura foi adicionado. Observou-se que o controle positivo aumentou a produção de ambas as citocinas (Figura 21 - B e C). Em culturas de esplenócitos estimulados com PMA+ionomicina, a indução da EAE diminui os níveis de IFN- γ em relação aos controles. O mesmo perfil de resposta foi observado quando animais EAE foram tratados com VU0409551 (Figura 21 – B). Nestas mesmas culturas, os níveis de IL-17 são aumentados com a indução da EAE, comparado aos controles. O tratamento com a droga (VU0409551) não alterou este perfil de resposta nos animais EAE, uma vez que os níveis de IL-17 não foram diferentes entre os grupos EAE veículo e EAE VU (Figura 21 – C). Quando as culturas de esplenócitos foram estimuladas com MOG, os níveis de IFN- γ aumentaram no grupo EAE veículo. O tratamento com VU0409551 não altera esta resposta, ou seja, os níveis de IFN- γ também se mostraram aumentados quando comparado ao controle (Figura 21 – D). O estímulo com MOG aumentou os níveis de IL-17 no grupo EAE que receberam apenas Veículo. Porém, o tratamento de animais EAE com VU0409551 reverteu este aumento de IL-17 induzido por MOG (Figura 21 – E). Além disso, as subpopulações celulares Th1 e Th17 foram analisadas por citometria de fluxo e, a partir disso, observou-se que a subpopulação de Th1 estava aumentada em animais EAE tratados apenas com Veículo, indicando que a resposta esperada pela indução do modelo foi confirmada. Além disso, ao tratar animais EAE com VU0409551, o aumento de células Th1 foi revertido parcialmente (Figura 21 – F). A subpopulação de células Th17 não foi alterada em nenhuma das condições (Figura 21 – G). Estes dados sugerem que o tratamento com VU0409551 pode ter um efeito singelo como imunomodulador na periferia, seja através da diminuição de produção de citocina IL-17 ou na modulação da subpopulação de células Th1. Entretanto, mais experimentos são necessários para confirmar sua participação no sistema imune periférico de forma robusta. Ademais, os resultados demonstram respostas clássicas do modelo EAE, indicando que a indução ocorreu de forma eficiente.

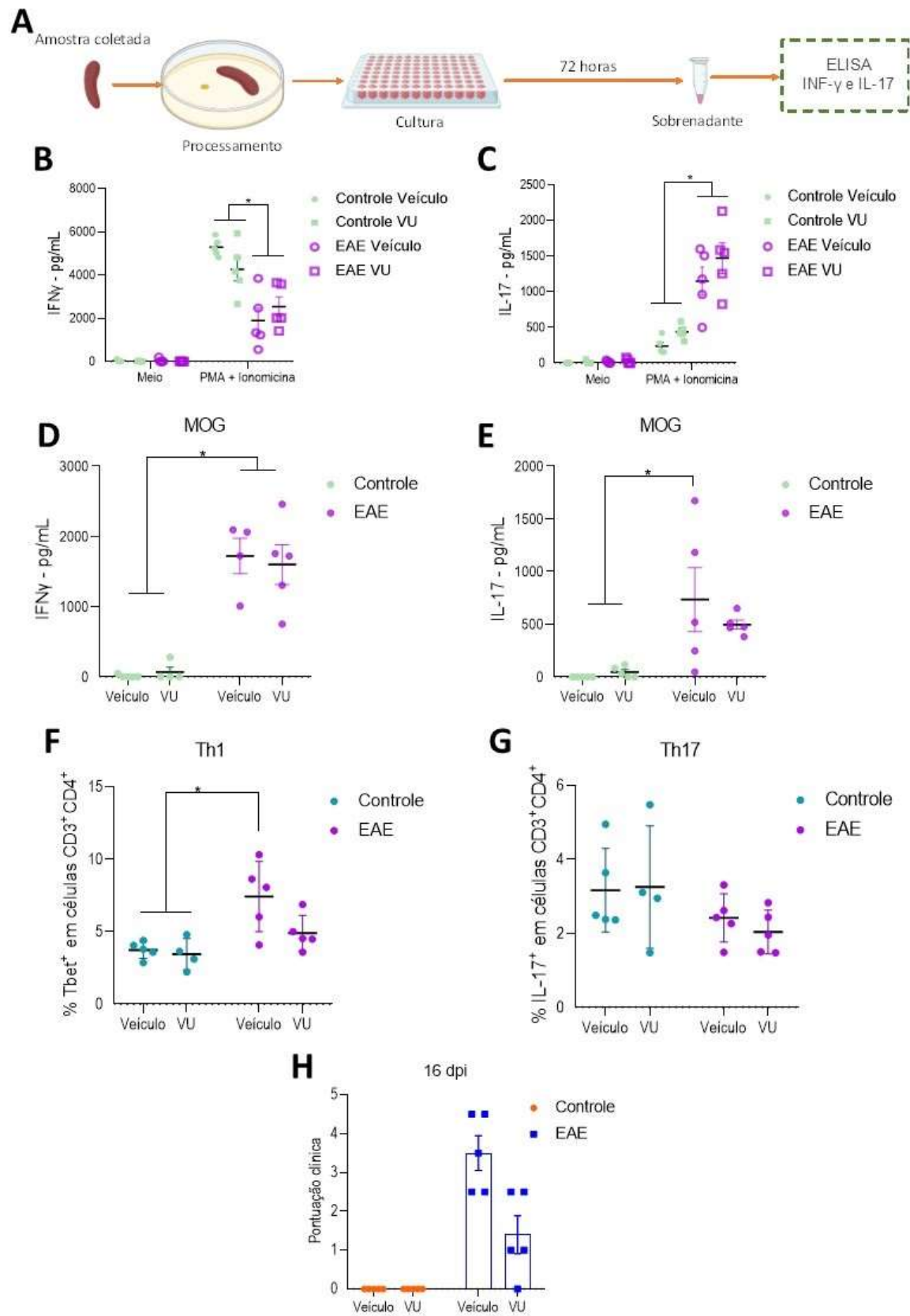


Figura 19 – O tratamento com VU0409551 reverte aumento de IL-17 e da subpopulação Th1 na periferia em animais EAE no pico do modelo (16 dpi) (A) Esquema do protocolo experimental para

coleta e processamento das amostras de baço, cultura celular por 72 horas e análise por ELISA das citocinas. (B) Níveis de IFN- γ após estimulação com PMA+Ionomicina. (C) Níveis de IL-17 após estimulação com PMA+Ionomicina. (D) Níveis de IFN- γ após estimulação com MOG. (E) Níveis de IL-17 após estimulação com MOG. (F) Porcentagem de células CD3+CD4+Tbet+ (Th1). (G) Porcentagem de células CD3+CD4+IL-17+ (Th17). (H) Pontuação clínica dos grupos experimentais aos 16 dias pós-indução (dpi). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.4 O tratamento com o VU0409551 regula negativamente proteínas e vias do sistema imune em animais EAE

Visando investigar o mecanismo molecular responsável pela melhora do score clínico do camundongo EAE tratados com VU0409551, foi realizada uma análise de proteômica da medula de animais durante o pico do score clínico (16 dpi). Primeiramente, avaliamos se a droga (VU0409551) seria capaz de induzir modificações nas proteínas diferencialmente expressas, independentemente da existência da doença. Para isso, usamos a comparação de animais Controle tratados com VU0409551 em relação aos animais Controle tratados apenas com Veículo. Foram encontradas 9 proteínas diferencialmente expressas entre os controles, sendo 2 reguladas positivamente e 7 reguladas negativamente (Tabela anexa 5) (Figura 23). Uma das proteínas reguladas positivamente, a Arl8a, é relacionada a transporte de vesículas pré-sinápticas em neurônios. Já as proteínas reguladas negativamente, em sua maioria, se relacionam a proteínas de colágeno e miosina. Para avaliar quais as modificações foram causadas pela indução da EAE, utilizamos a comparação de animais EAE que receberam apenas Veículo em relação aos animais Controle que receberam apenas Veículo. Desta forma, observou-se que a indução da EAE levou a uma alteração da expressão de 117 proteínas, sendo 106 reguladas positivamente e 11 reguladas negativamente (Tabela anexa 6) (Figura 24 - C). Entre as proteínas reguladas positivamente, observa-se que elas são majoritariamente relacionadas ao sistema imunológico. A análise de enriquecimento de vias mostra as vias celulares às quais essas proteínas estão envolvidas (Figura 24 - A). Esta comparação elucida as diferenças que são encontradas ao induzir a EAE nos animais, mostrando que esta indução regula positivamente várias vias do sistema imune. Porém, para entender o papel do tratamento com VU0409551 em animais EAE, é preciso observar a comparação de animais EAE tratados com VU0409551 e EAE tratados com Veículo. A partir desta comparação foram encontradas 115 proteínas diferencialmente

expressas, sendo 2 reguladas positivamente e 113 reguladas negativamente (Tabela anexa 7) (Figura 23 – D). A maioria destas proteínas negativamente expressas também são relacionadas ao sistema imune, sendo que algumas das proteínas previamente reguladas positivamente na comparação entre EAE Veículo e Controle Veículo, agora estão reguladas negativamente (ex.: *Serpina3n*, *C1qc* e *Itgb2*). A análise de enriquecimento de vias da comparação entre EAE VU e EAE Veículo também demonstra que várias das vias que se mostraram reguladas positivamente em função da EAE agora se mostram reguladas negativamente (Figura 24 – B). Ou seja, o tratamento com VU0409551 foi capaz de normalizar o aumento de expressão dessas proteínas envolvidas no sistema imune em camundongos EAE.

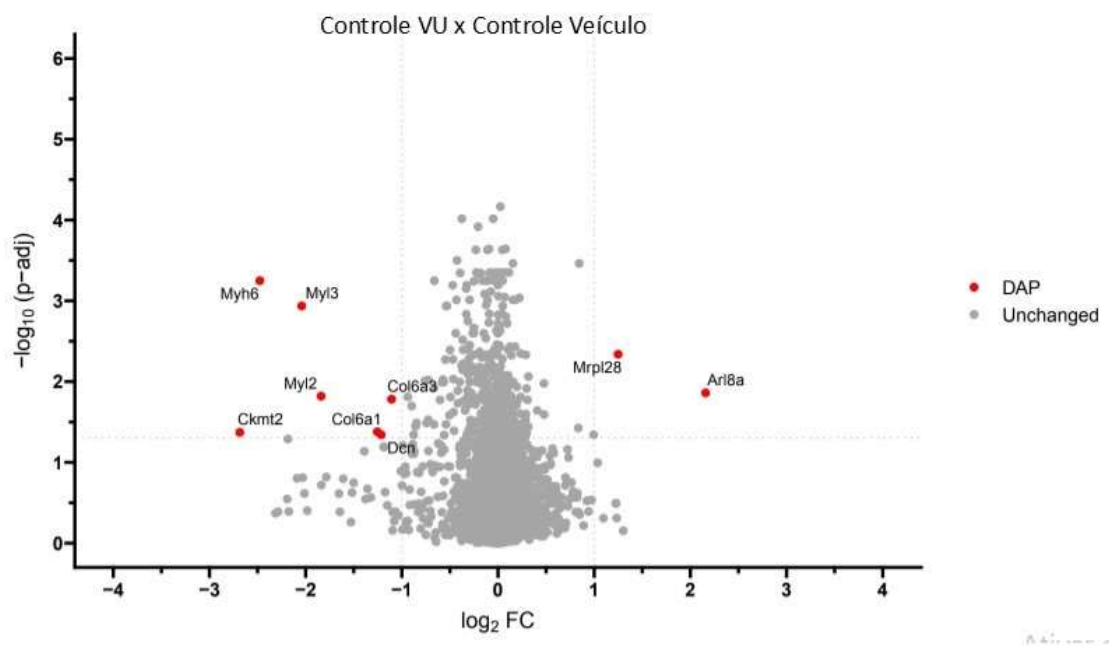


Figura 20 – O uso da droga em animais sem condições patológicas não ocasiona em mudanças de perfil proteômico. Gráfico de vulcano mostrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação EAE Veículo x Controle Veículo. Os dados apresentados em vermelho representam as proteínas diferencialmente expressas de forma significativa ($\log_2 FC \leq -1$ ou ≥ 1 e $p < 0,05$).

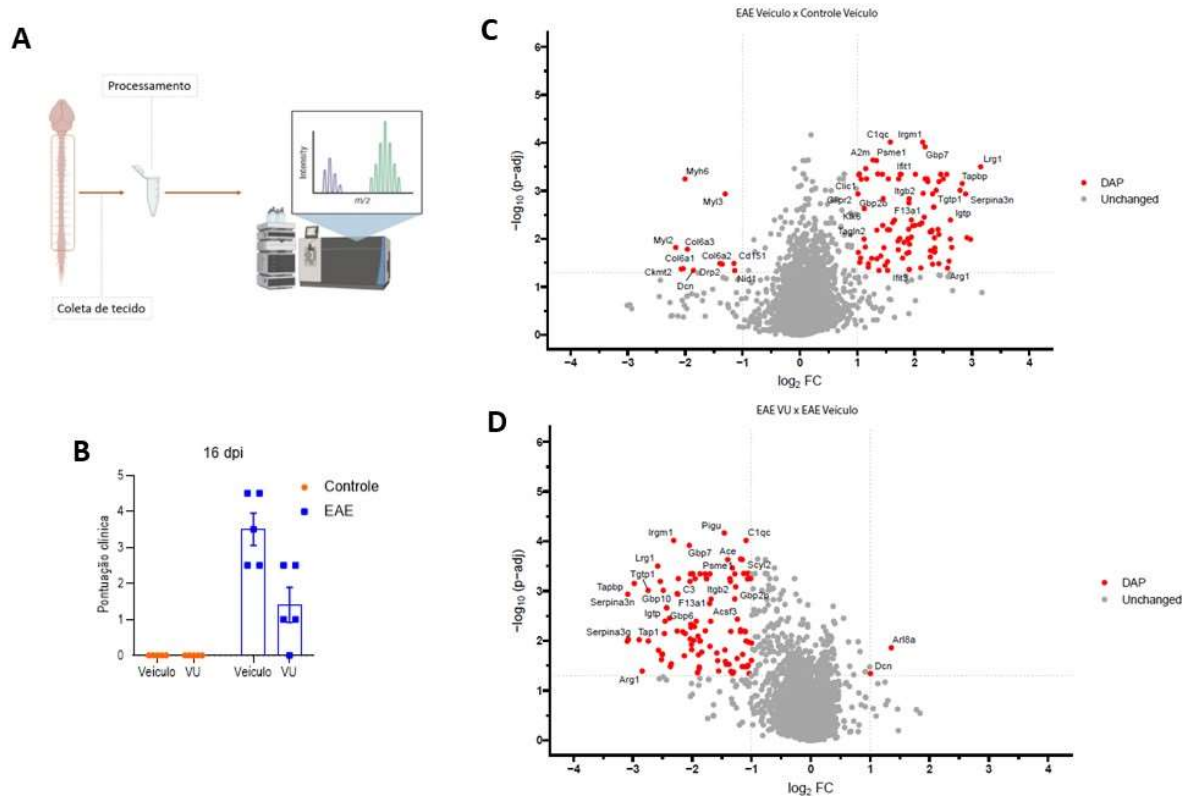


Figura 21 – O tratamento com VU0409551 regula negativamente proteínas do sistema imune em animais EAE no pico do modelo (16 dpi). (A) Esquema experimental representando o processamento de tecido para análise proteômica. (B) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução da EAE (dpi). (C) Gráfico de vulcano mostrando proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação EAE Veículo x Controle Veículo. (D) Gráfico de vulcano mostrando DAPs na comparação EAE VU x EAE Veículo. Os dados apresentados em vermelho representam as proteínas diferencialmente expressas de forma significativa ($\log_2 FC \leq -1$ ou ≥ 1 e $p < 0,05$).

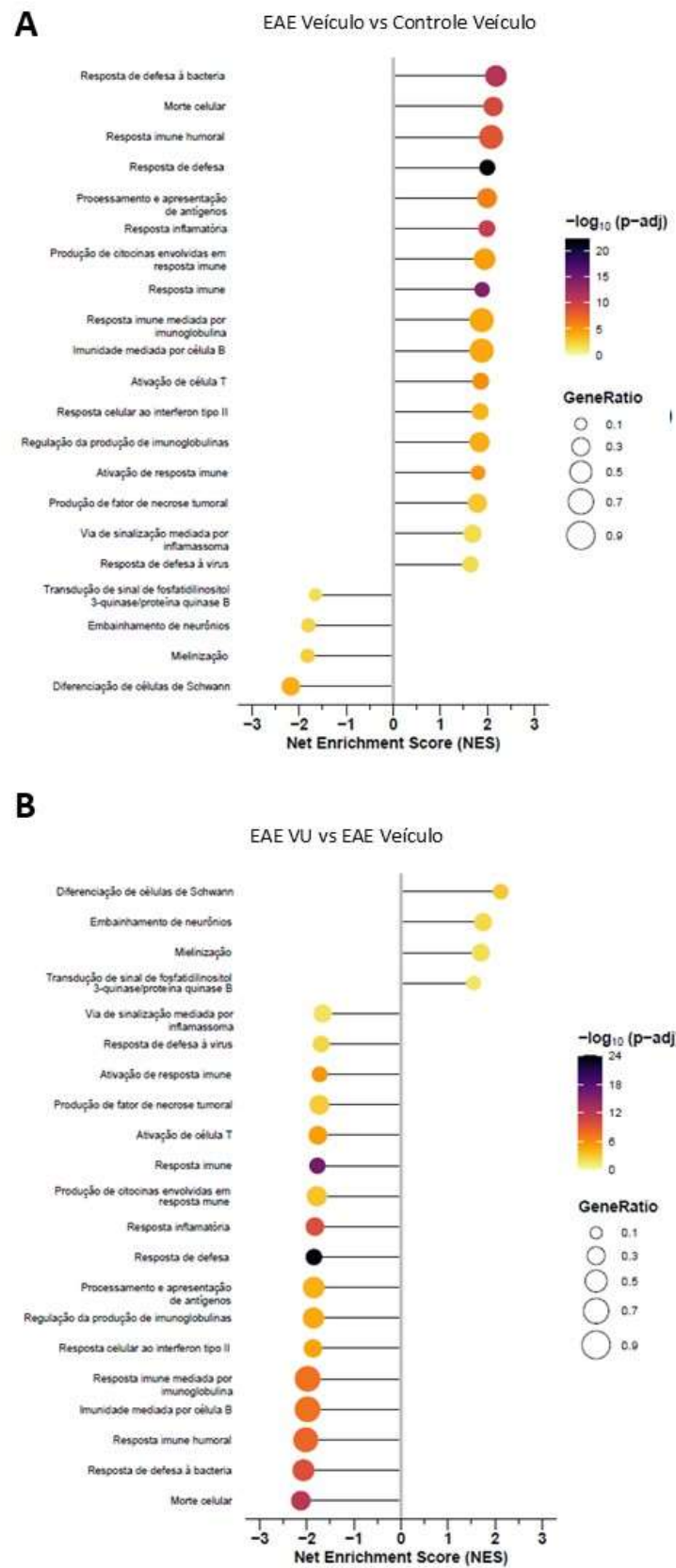


Figura 22 – O tratamento com VU0409551 regula negativamente vias do sistema imune em animais EAE no pico do modelo (16 dpi). (A) Análise de enriquecimento de vias para a comparação EAE Veículo x Controle Veículo. (B) Análise de enriquecimento de vias para a comparação EAE VU x EAE Veículo.

Uma vez que observamos alterações da expressão de diversas proteínas durante o pico dos sinais clínicos, decidimos avaliar, utilizando a técnica de RT-qPCR, a expressão gênica de alguns marcadores no córtex e medula durante a fase de remissão (28 dpi) do modelo (Figura 25 – A). Analisamos componentes importantes da resposta imune: IL-1 β , TNF e IL-6. No córtex, observou-se que animais EAE apresentam aumento dos níveis apenas de TNF. Ao tratar animais EAE com VU0409551 este aumento foi revertido. Os níveis de IL-6 não foram alterados pela indução da EAE, porém, estão aumentados no grupo EAE tratado com VU0409551 (Figura 25 – C-E). Na medula, nenhum dos marcadores imunes foi alterado pela indução da EAE ou pelo tratamento com VU0409551 (Figura 26 – A-C). Ademais, avaliamos componentes importantes para a resposta de mielinização e diferenciação de oligodendrócitos, BDNF e TGF- β (Esmaeilzadeh; Mohammadi; Elahi, 2023; Xiao, 2023). Porém, em ambos os tecidos avaliados, nenhum dos marcadores foi alterado (Figura 25 – F e G; Figura 26 – D e E). Assim, essas análises indicam que a maior parte das alterações de expressão gênica ocorrem durante o pico e que poucas alterações são observadas durante a fase de remissão.

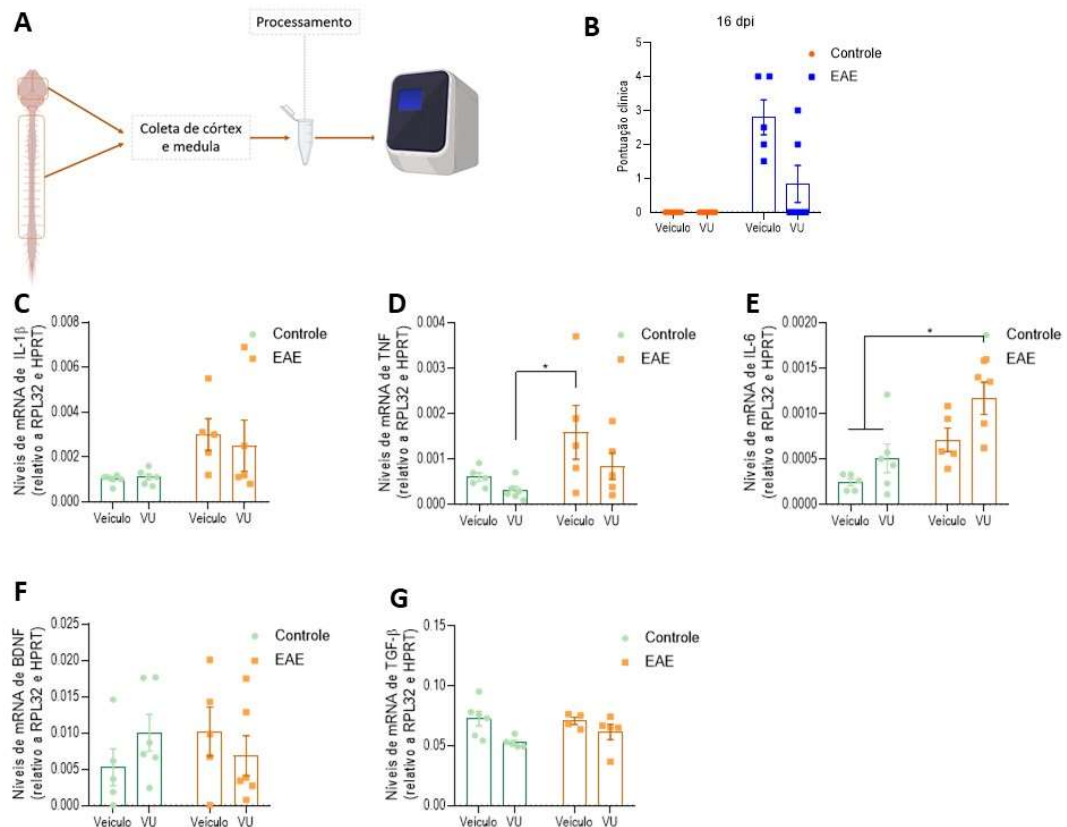


Figura 23 – O tratamento com VU0409551 em animais EAE reverte aumento de expressão gênica de TNF no córtex na fase de remissão do modelo (28 dpi). (A) Esquema experimental representando

o processamento do córtex cerebral e medula espinhal para análise por RT-qPCR. (B) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. (C-G) Análise de RT-qPCR no córtex cerebral: (C) Níveis relativos de mRNA para IL-1 β , (D) TNF, (E) IL-6, (F) BDNF, (G) TGF- β . Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

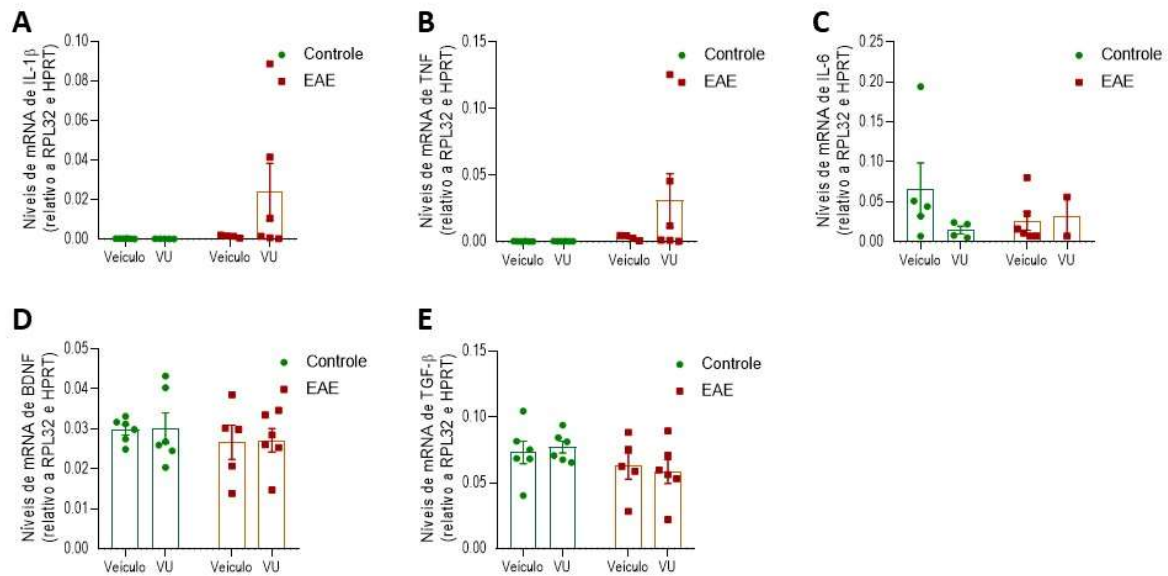


Figura 24 – A expressão gênica de marcadores inflamatórios e relacionados a mielinização não é alterada em nenhuma das condições avaliadas no período de remissão do modelo (28 dpi). (A-F) Análise de RT-qPCR na medula: (A) Níveis relativos de mRNA para IL-1 β , (B) TNF, (C) IL-6, (D) BDNF, (E) TGF- β . Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.5 O tratamento com VU0409551 diminui o número de astrócitos em animais EAE.

Os astrócitos podem ter papéis protetores ou prejudiciais na EM (Aharoni; Eilam; Arnon, 2021; Ludwin et al., 2016; Molina-Gonzalez; Miron, 2019; Ponath; Park; Pitt, 2018; Xia et al., 2020). Eles são as células mais abundantes do SNC e expressam baixas concentrações de receptores mGluR5 em condições normais. Porém, em contextos de doença, a expressão deste receptor é aumentada (Geurts et al., 2003; Gwak; Hulsebosch, 2005). Utilizando fatias de córtex pré-frontal coletadas durante a remissão do modelo (28dpi), foi realizada imunohistoquímica (IHC) com anticorpo anti-S100 β , marcador específico de astrócitos. Observou-se um aumento no número de

astrócitos nos animais EAE tratados com Veículo, aumento este revertido pelo tratamento com VU0409551 (Figura 28 – B).

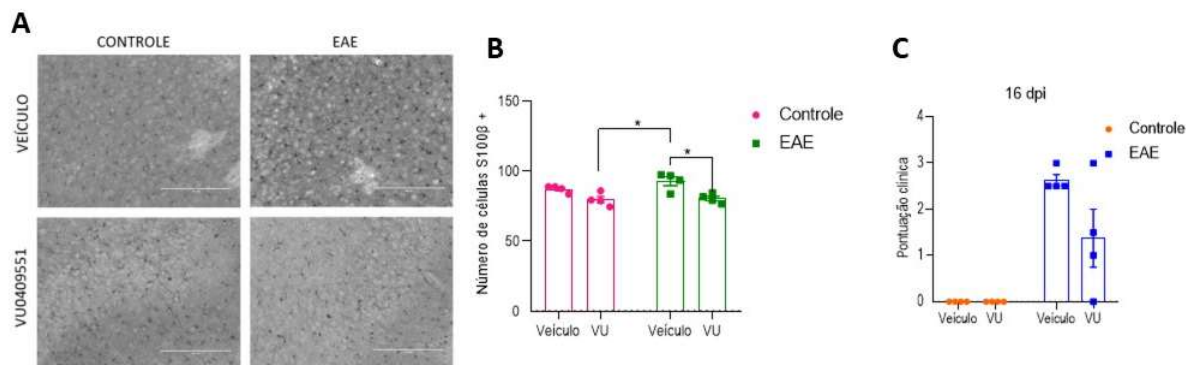


Figura 25 – O tratamento com VU0409551 reverte aumento no número de astrócitos no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi). (A) Imagens representativas de imunomarcagem para S100 β no córtex cerebral de camundongos nos grupos Controle e EAE, tratados com Veículo ou VU0409551 (escala: 100 μ m). (B) Quantificação do número de células S100 β ⁺ no córtex cerebral. (C) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

O componente C3 do complemento é conhecido como um ótimo marcador de ativação astrogliar (Liddel et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que a expressão de C3 é aumentada no modelo EAE (Hammond et al., 2020; Tassoni et al., 2019). Para avaliar se o tratamento com VU0409551 poderia diminuir a ativação dos astrócitos, analisamos a expressão gênica deste marcador na medula e córtex destes animais no período de remissão (28 dpi) do modelo. Na medula, observou-se que não existe diferença significativa na expressão gênica de C3 em animais EAE tratados apenas com Veículo. No entanto, ocorreu um aumento nos níveis de C3 nos animais EAE tratados com VU0409551 comparados ao grupo Controle Veículo (Figura 28 – A). No córtex, os animais EAE tratados com Veículo tiveram os níveis de mRNA de C3 aumentados. Por outro lado, o tratamento com VU0409551 reverteu este aumento na expressão de C3 nos animais EAE (Figura 28 – B). Estes dados indicam que a modulação através da droga VU0409551 pode atuar de maneiras diferentes e de forma dependente da região/tecido analisado.

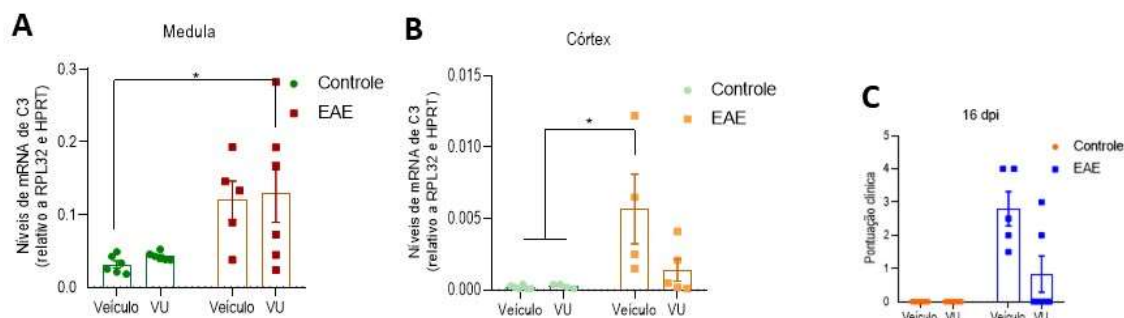


Figura 26 – O tratamento com VU0409551 reduz o aumento de expressão de mRNA de C3 no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi). (A) Níveis relativos de mRNA de C3 na medula espinhal (relativos a RPL32 e HPRT). (B) Níveis relativos de mRNA de C3 no córtex cerebral (relativos a RPL32 e HPRT). (C) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.6 O tratamento com VU0409551 diminui a expressão de mRNA de marcadores de oligodendrócitos associados a doenças em animais EAE.

Os oligodendrócitos são uma das células do SNC que expressam a maior quantidade de mGluR5, tornando-os alvo para o estudo das ações farmacológicas relacionadas a este receptor (Butt et al., 2017; Luyt; Varadi; Molnar, 2003; Spampinato et al., 2018c). Para avaliar se o tratamento com VU0409551 altera parâmetros de mielinização no período de remissão (28 dpi) do modelo, utilizamos a técnica de imunofluorescência (IF) com um marcador de oligodendrócitos maduros, a proteína básica de mielina (MBP). Um estudo amplo e recente demonstrou a presença de marcadores específicos e confiáveis em oligodendrócitos que eram exclusivos de condições como a EM, EAE e outras doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Kenigsbuch et al., 2022). Os principais marcadores de EAE descobertos neste estudo foram a Serpina3n, H2D1, B2m e C4b, sendo que alguns destes mesmos marcadores estavam diferencialmente expressos nos nossos dados proteômicos. Assim, utilizamos amostras coletadas na remissão (28 dpi) do modelo e, através da técnica de RT-qPCR, analisamos a expressão de MBP, C4b, Serpina 3n, B2M e H2D1.

A indução da EAE e o tratamento com VU0409551 não alteraram a intensidade de fluorescência de MBP no córtex, no período de remissão do modelo (28 dpi), sugerindo que, neste período avaliado (28 dpi), as alterações de desmielinização não estavam mais evidentes no córtex (Figura 29 – A e B). Além disso, quando avaliada

por RT-qPCR, a expressão gênica de MBP no córtex não foi alterada em função da indução da EAE e em nenhuma das outras condições (Figura 30 – A). O marcador de ativação de oligodendrócitos e componente do sistema complemento C4b teve sua expressão gênica aumentada no córtex nos animais EAE veículo, quando comparado aos controles. Entretanto, quando os animais EAE foram tratados com VU0409551, a expressão de C4b diminuiu para níveis similares ao controle (Figura 30 - B). Os níveis de expressão gênica de Serpina3n estavam aumentados em animais EAE tratados apenas com veículo e o tratamento com VU0409551 diminuiu estes níveis (Figura 30 – C). A expressão gênica de B2M não foi diferente entre as condições avaliadas. Figura 30 – D). A expressão gênica de H2D1 de animais EAE tratados apenas com Veículo foi aumentada e o tratamento com VU0409551 diminuiu estes níveis (Figura 30 – E). Estes dados sugerem que o tratamento com VU0409551 pode atuar de forma a modular a expressão gênica de marcadores de oligodendrócitos associados a doença no córtex de animais EAE.

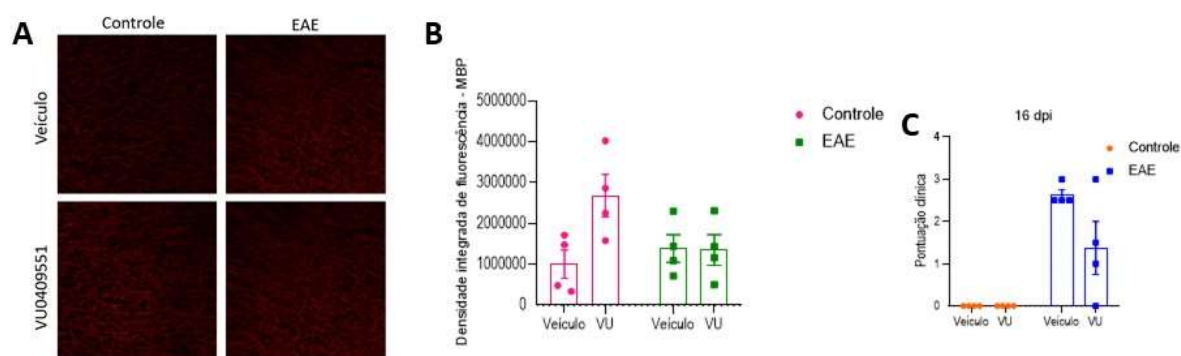


Figura 27 – A intensidade de fluorescência de MBP não é alterada no córtex de animais EAE no período de remissão do modelo (28 dpi). (A) Imagens representativas de imunomarcagem para MBP no córtex cerebral de camundongos dos grupos Controle e EAE, tratados com Veículo ou VU0409551 (escala: 100 μ m). (B) Quantificação da densidade integrada de fluorescência de MBP no córtex cerebral. (C) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

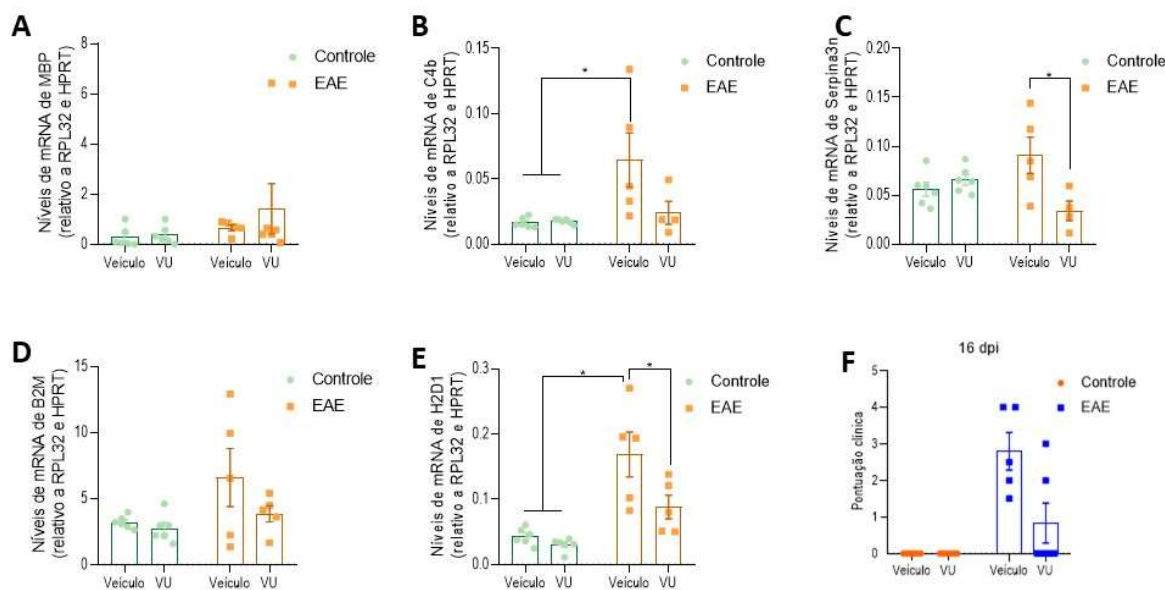


Figura 28 – O Tratamento com VU0409551 diminui marcadores de oligodendrócitos associados a doença no período em animais EAE, no período de remissão (28 dpi). (A-E) Análise de RT-qPCR no córtex cerebral: (A) Níveis relativos de mRNA para MBP, (B) C4b, (C) Serpina3n, (D) B2M, (E) H2D1 (todos relativos a RPL32 e HPRT). (F) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

Na medula, assim como nos resultados de IF e RT-qPCR no córtex, os níveis de MBP não foram alterados em nenhuma das condições analisadas (Figura 31 – A), enquanto os níveis de mRNA de C4b aumentaram em animais EAE, tratados com Veículo ou VU0409551 (Figura 31 – B). A expressão gênica de Serpina3n (Figura 31 – C) e H2D1 (Figura 31 – E) não foram alteradas em nenhuma das condições avaliadas. Os níveis de mRNA de B2M não foram significativamente alterados em animais EAE tratados apenas com veículo; porém, em animais EAE tratados com VU0409551, ocorreu aumento deste marcador (Figura 321 – D). Assim, nossos resultados sugerem que, na medula, o tratamento com VU0409551 altera apenas a expressão gênica de B2M, aumentando-a. Isso indica que a modulação que VU0409551 exerce sobre marcadores de oligodendrócitos associados a doença é região específica.

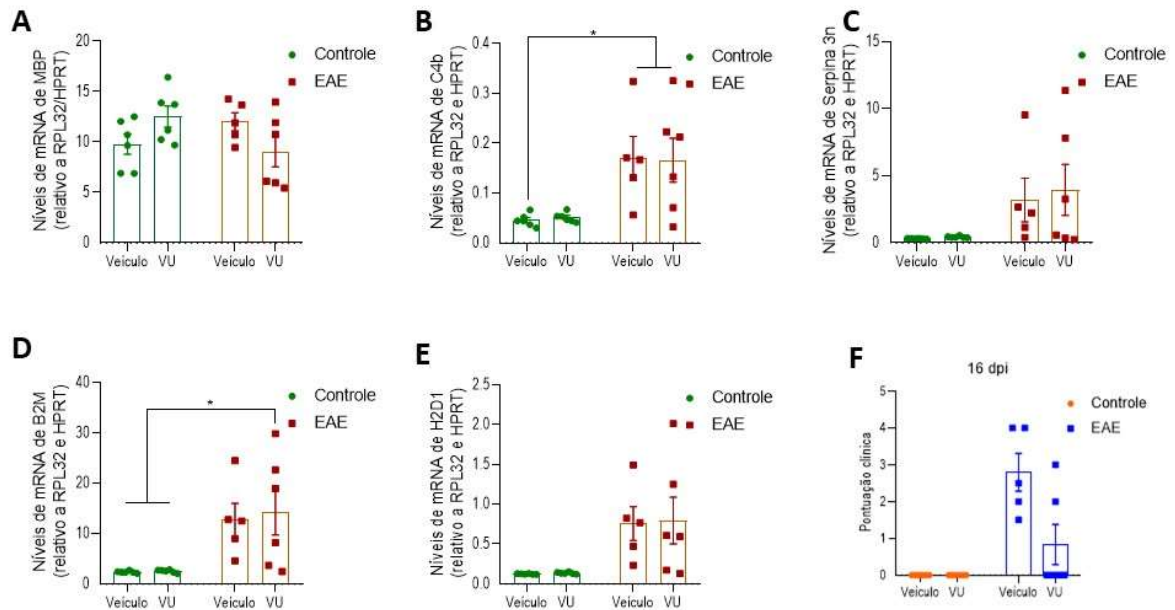


Figura 29 – O tratamento com VU0409551 aumenta níveis de mRNA de B2M na medula no período de remissão (28 dpi). (A-E) Análise de RT-qPCR na medula espinhal: (A) Níveis relativos de mRNA para MBP, (B) C4b, (C) Serpina3n, (D) B2M, (E) H2D1 (todos relativos a RPL32 e HPRT). (F) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

5.7 Animais EAE tratados com VU0409551 não apresentam aumento de micróglia no córtex e o número de micróglia é influenciado pela pontuação clínica dos animais.

Para avaliarmos o número de micróglia na remissão (28 dpi) do modelo, utilizamos fatias de córtex e marcamos as células através da técnica de IHC com anticorpo anti-Iba-1, marcador de micróglia. A indução do modelo EAE altera o número de micróglia no córtex, porém, foi observado um aumento apenas em animais EAE tratados com veículo (Figura 32 – A e B). Como em processos de doença, como na EM, ocorre também a ativação das micróglia, (Correale, 2014), utilizamos a técnica de imunofluorescência, com marcação de anticorpos anti-Iba1 e anti-CD68, para avaliar a ativação microglial (Figura 33 – A). Animais EAE tratados apenas com veículo apresentaram aumento do número de micróglia e, ao tratar animais EAE com VU0409551, este aumento é revertido (Figura 33 – B). Contudo, a área de micróglia, intensidade de IBA, intensidade de CD68 em células IBA1+ e o número de punctas de CD68 não foram alterados em nenhuma das condições. Estes resultados indicam que,

na fase de remissão do modelo, não ocorre ativação microglial no córtex de animais EAE (Figura 34 – A-G).

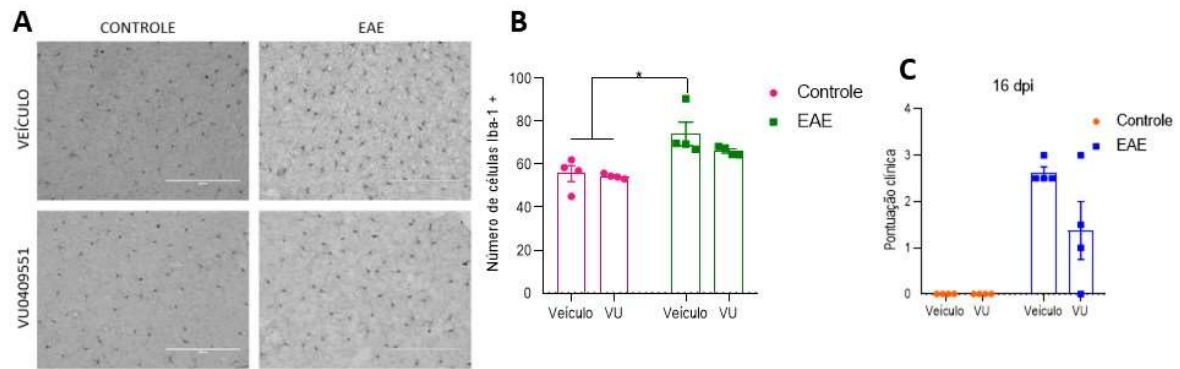


Figura 30 – No período de remissão (28 dpi), o número de micróglia no córtex é aumentado em animais EAE tratados apenas com Veículo, mas não em animais EAE tratados com VU0409551. (A) Imagens representativas de imunomarcagem para Iba-1 no córtex cerebral de camundongos nos grupos Controle e EAE, tratados com Veículo ou VU0409551 (escala: 100 μ m). (B) Quantificação do número de células Iba-1+ no córtex cerebral. (C) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

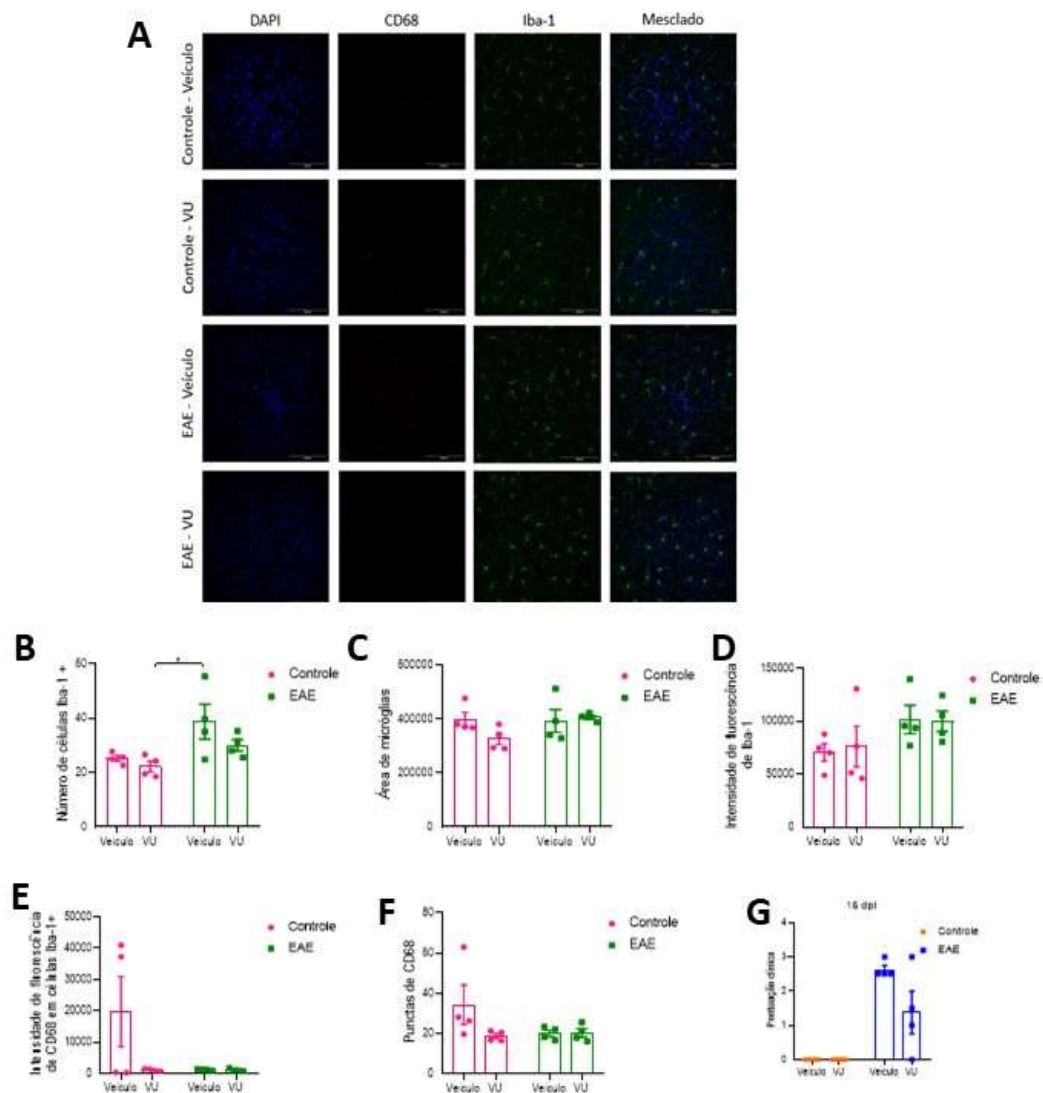


Figura 31 – As micróglia do córtex não apresentam sinais de ativação celular no período de remissão (28 dpi) do modelo. (A) Imagens representativas de imunomarcagem para DAPI, CD68, Iba-1 e mesclado no córtex cerebral dos grupos Controle e EAE, tratados com Veículo ou VU0409551 (escala: 100 μ m). (B) Quantificação do número de células Iba-1+ no córtex cerebral. (C) Área das micróglia. (D) Intensidade de fluorescência de Iba-1. (E) Intensidade de fluorescência de CD68 em células Iba-1+. (F) Punctas de CD68. (G) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

A pontuação clínica dos animais EAE pode variar de 0 a 5, sendo 0 a ausência de sinais clínicos e 5 a morte. Visto que a pontuação clínica demonstra a severidade da doença, além da incapacidade clínica, decidimos avaliar se os parâmetros de ativação microglial são influenciados pela escala utilizada. Primeiro, a nível de indivíduo, observamos que existe um efeito significativo e positivamente linear entre a pontuação clínica e o número de micróglia (Figura 34 – A). Em seguida, para verificar

quais grupos teriam diferença na relação “pontuação clínica/número de micróglias”, foi realizado o pós-teste de Emmeans. Verificou-se que os animais EAE, tratados com veículo ou VU0409551, apresentam um aumento no número de micróglias em pontuações clínicas maiores, porém com maior intensidade em animais EAE Veículo (Figura 34 – A). A diferença entre grupos EAE sugere que quanto maior a gravidade da doença, maior é o número de micróglias, porém o tratamento com VU0409551 pode atenuar este aumento.

Para investigar o efeito do tratamento com VU0409551 nas características das micróglias, realizou-se uma análise de componentes principais (PCA) utilizando os parâmetros microgliciais analisados (Figura 33). A PCA revelou que o primeiro componente principal (PC1), responsável por 40,6% da variância, está fortemente associada à intensidade de IBA, à área das micróglias e também, mas em menor proporção, à intensidade de CD68 e à pontuação de CD68. Isso sugere que a PC1 representa um eixo de variação relacionado à ativação e à morfologia das micróglias. O segundo componente principal (PC2), que explica 22,1% da variância, é mais fortemente associada à pontuação clínica. Sobre a diferença entre grupos, existe uma tendência de agrupamento das micróglias de acordo com os grupos aos quais pertencem apenas verticalmente, portanto, associada fortemente à pontuação clínica. As micróglias do grupo EAE Veículo estão agrupadas majoritariamente na parte superior do PC2, em conjunto com algumas micróglias do grupo EAE VU. Porém, o restante das micróglias do grupo EAE VU sobrepõem espacialmente com as micróglias dos grupos Controles. Este padrão sugere que, apesar da pontuação clínica separar os grupos EAE dos grupos Controle, ainda existem micróglias do grupo EAE VU com características de ativação similares às micróglias dos grupos controle, indicando um potencial do VU0409551 em reverter parcialmente as alterações das micróglias decorrentes da EAE (Figura 34 – B).

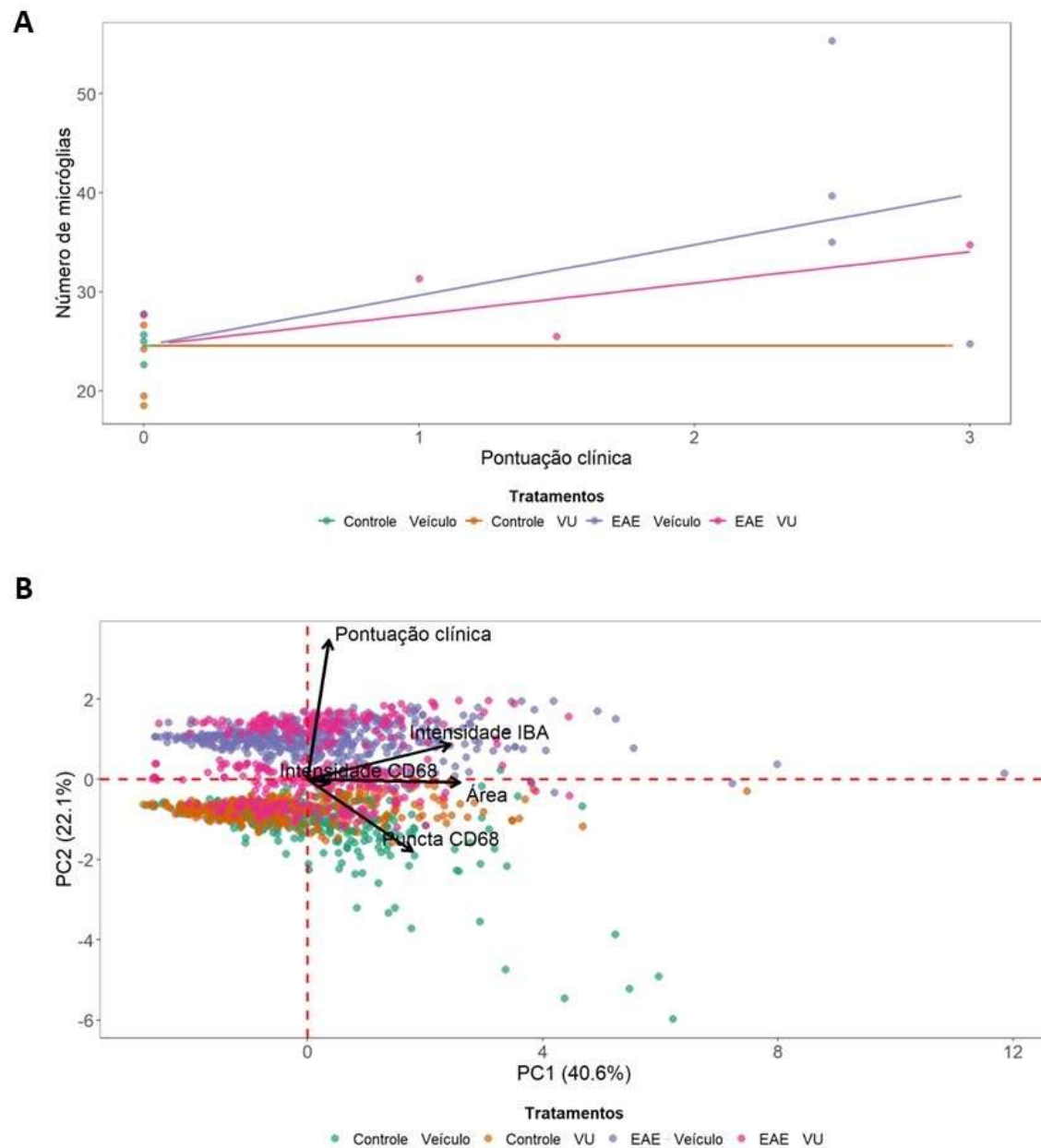


Figura 32 – Quanto maior a pontuação clínica, maior o número de micróglia no período de remissão (28 dpi) do modelo EAE. (A) Predição do modelo ajustado entre número de micróglia, tratamentos e pontuação clínica. (B) Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros de ativação da micróglia, incluindo intensidade de IBA, intensidade de CD68, área, puncta de CD68 e pontuação clínica, nos diferentes grupos de tratamento. Cada dado demonstrado (círculos preenchidos) na figura (A) são representações de indivíduos (animais), coloridos de acordo com o grupo pertencente. Os dados (círculos preenchidos) na figura (B) são representações a nível de micróglia, coloridas de acordo com o grupo pertencente.

5.8 Quanto maior a pontuação clínica dos animais, menor o comprimento médio do ramo das micróglia

Realizamos análises morfológicas de micróglia em amostras de córtex pré-frontal na remissão do modelo (28 dpi). A área das micróglia, raio médio, número de ramificações, número de junções, diâmetro do corpo celular e comprimento máximo do ramo não foram diferentes entre animais Controle e EAE, indicando que tais parâmetros não foram alterados pela indução do modelo EAE (Figura 35 – A-G). Porém, também realizamos análises a nível de micróglia. Uma micróglia ativada passa por um processo de diminuição no tamanho dos seus ramos e adquire uma forma ameboide, semelhante ao macrófago periférico (Vidal-Itriago et al., 2022). Por isso, avaliamos se a pontuação clínica poderia influenciar nestes parâmetros, através de uma análise PCA (Figura 36). Nesta representação, podemos observar que a PC1, que explica 48,7% da variância, está associada à área e ao número de ramos das micróglia, enquanto a PC2, que explica 26,2% da variância, foi mais influenciada pelo comprimento médio dos ramos das micróglia e pontuação clínica. Na PC2, foi observada uma relação inversamente proporcional entre comprimento médio dos ramos e pontuação clínica, indicando que o comprimento médio dos ramos está negativamente correlacionado com a gravidade da doença. Essa relação pode indicar que micróglia com ramos mais curtos estão em estados mais ativados e, consequentemente, associadas a pontuações clínicas maiores, como seria esperado. A distribuição vertical das micróglia em função dos grupos mostra, ainda, uma tendência de agrupamento das micróglia dos grupos EAE Veículo e EAE VU na porção inferior do PC2, enquanto as micróglia dos grupos Controle Veículo e Controle VU tendem a se agrupar na parte superior. Apesar da separação vertical não ser tão evidente como observado para parâmetros de ativação das micróglia (Figura 35), ainda é possível observar uma maior frequência das micróglia do grupo EAE VU sobrepostas com as micróglia dos grupos Controles. Esta sobreposição sugere, ainda que de maneira menos eficiente que para a ativação, o potencial do tratamento com VU0409551 nas reversões das alterações morfológicas das micróglia.

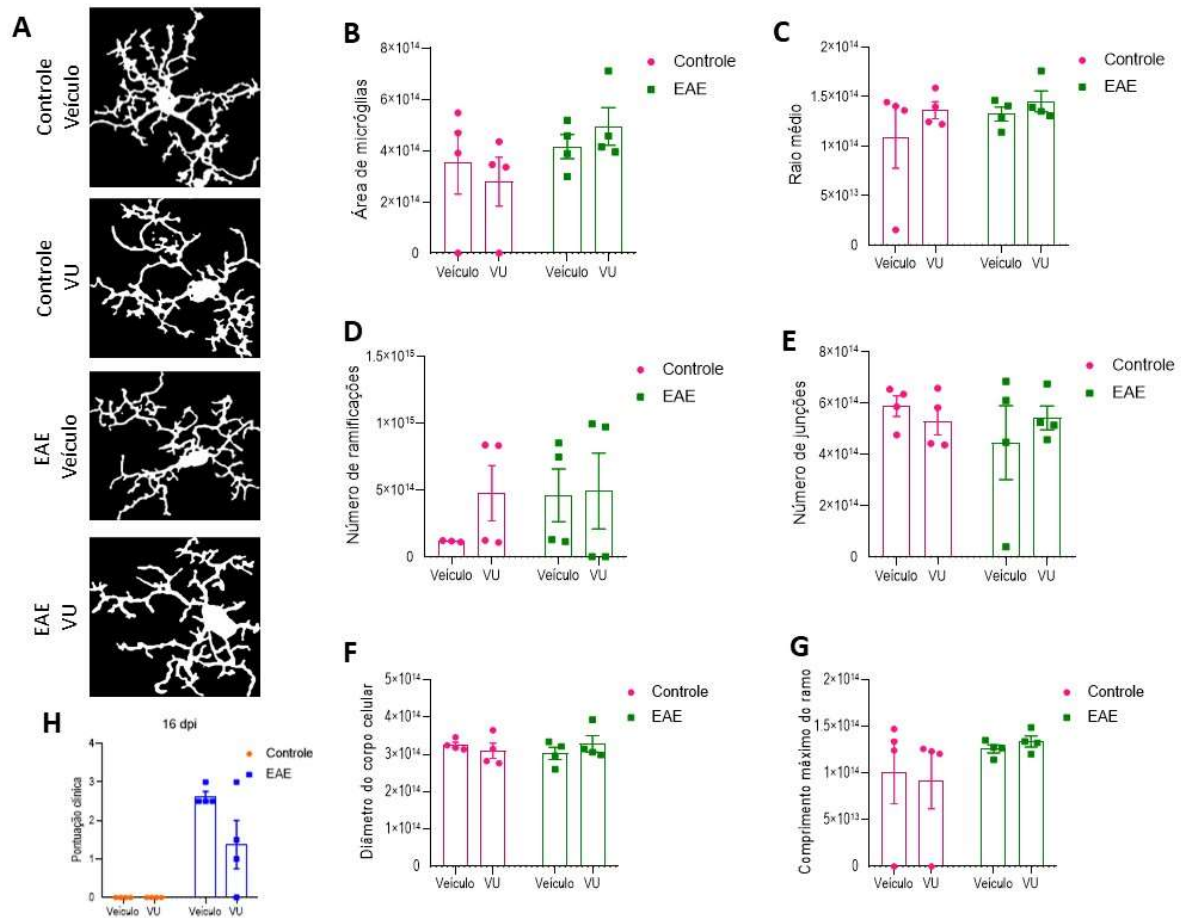


Figura 33 – A morfologia de micróglia não é alterada no córtex no período de remissão (28 dpi) do modelo. (A) Imagens representativas da morfologia de micróglia nos diferentes grupos experimentais. (B) Área de micróglia. (C) Raio médio. (D) Número de ramificações. (E) Número de junções. (F) Diâmetro do corpo celular. (G) Comprimento máximo do ramo. (H) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

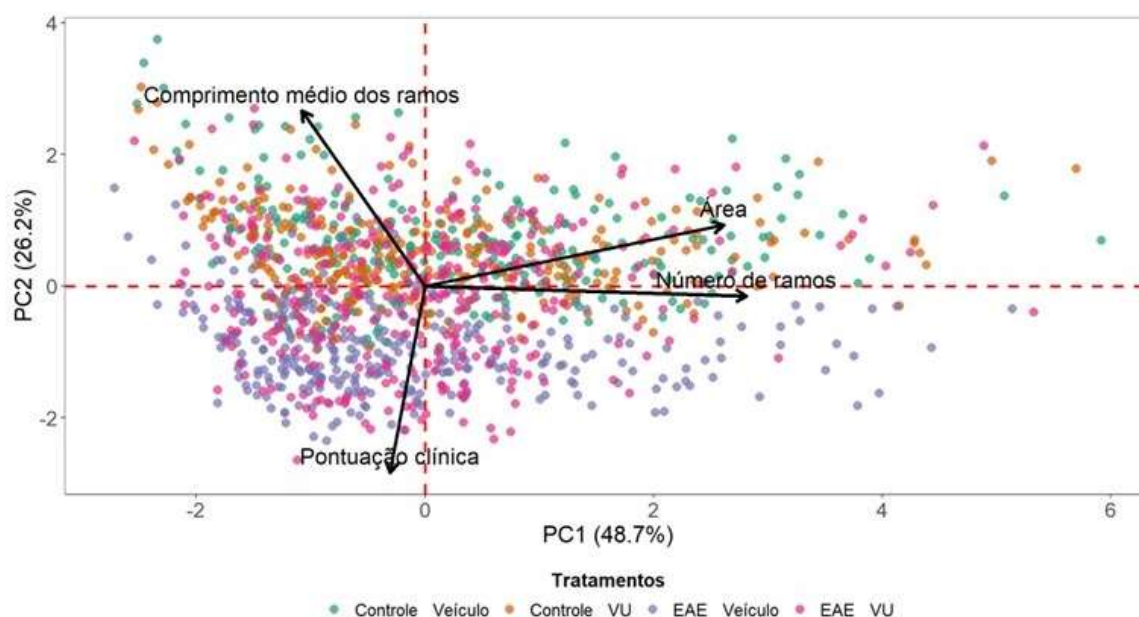


Figura 34 – Quanto maior a pontuação clínica dos animais, menor é o comprimento médio dos ramos de micróglia, no córtex e no período de remissão (28 dpi) do modelo EAE. O gráfico mostra a distribuição das células microgliais dos diferentes grupos experimentais no espaço formado pelos componentes principais 1 (PC1, 48,7% da variância) e 2 (PC2, 26,2% da variância), além dos vetores das variáveis analisadas: área, número de ramos, comprimento médio dos ramos e pontuação clínica.

5.9 Micróglia TNF+ estão aumentadas no grupo EAE Veículo, mas não no grupo EAE VU.

No início do desenvolvimento do modelo EAE, onde ocorrem processos inflamatórios, os monócitos migram da periferia para o SNC e são capazes de promover inflamação no SNC (McGinley et al., 2018). Além disso, existe uma dificuldade metodológica em distinguir micróglia de monócitos, tanto por sua morfologia, quanto por sua funcionalidade. Sendo assim, utilizamos tecido cerebral e avaliamos por citometria de fluxo estas duas populações celulares, a fim de averiguar seus papéis, separadamente, no pico (16dpi) do modelo. Houve um aumento de porcentagem de monócitos nos animais EAE tratados apenas com Veículo. O tratamento com VU0409551 reverte parcialmente este aumento (Figura 37 – C). Analisamos subpopulações de monócitos que eram positivas para IL-10 ou TNF. Monócitos positivos para TNF não foram alterados pela indução da EAE ou nenhuma das outras condições (Figura 37 -D). Animais EAE tratados apenas com Veículo não apresentam alterações na porcentagem de monócitos positivos para IL-10 (Figura 37

-E). A porcentagem de micróglia não foi alterada em nenhuma das condições (Figura 37 – F). Porém, quando analisamos as subpopulações de micróglia que eram positivas para TNF e IL-10, observa-se que a animais EAE tratados apenas com veículo apresentam aumento na subpopulação TNF positiva. O tratamento com VU0409551 reverte parcialmente a % de micróglia positivas para TNF (Figura 37 – G). Animais EAE tratados apenas com Veículo não tiveram alterações na porcentagem de micróglia positivas para IL-10. O tratamento com VU0409551 também não alterou a porcentagem desta subpopulação celular (Figura 37 – H). Esses resultados sugerem que, possivelmente, o tratamento com VU0409551 atua modulando a resposta inflamatória das micróglia, especialmente com relação à produção de TNF- α . Além disso, a infiltração de monócitos parece ser reduzida pelo tratamento com VU0409551. Entretanto, mais experimentos serão importantes para confirmar esses achados.

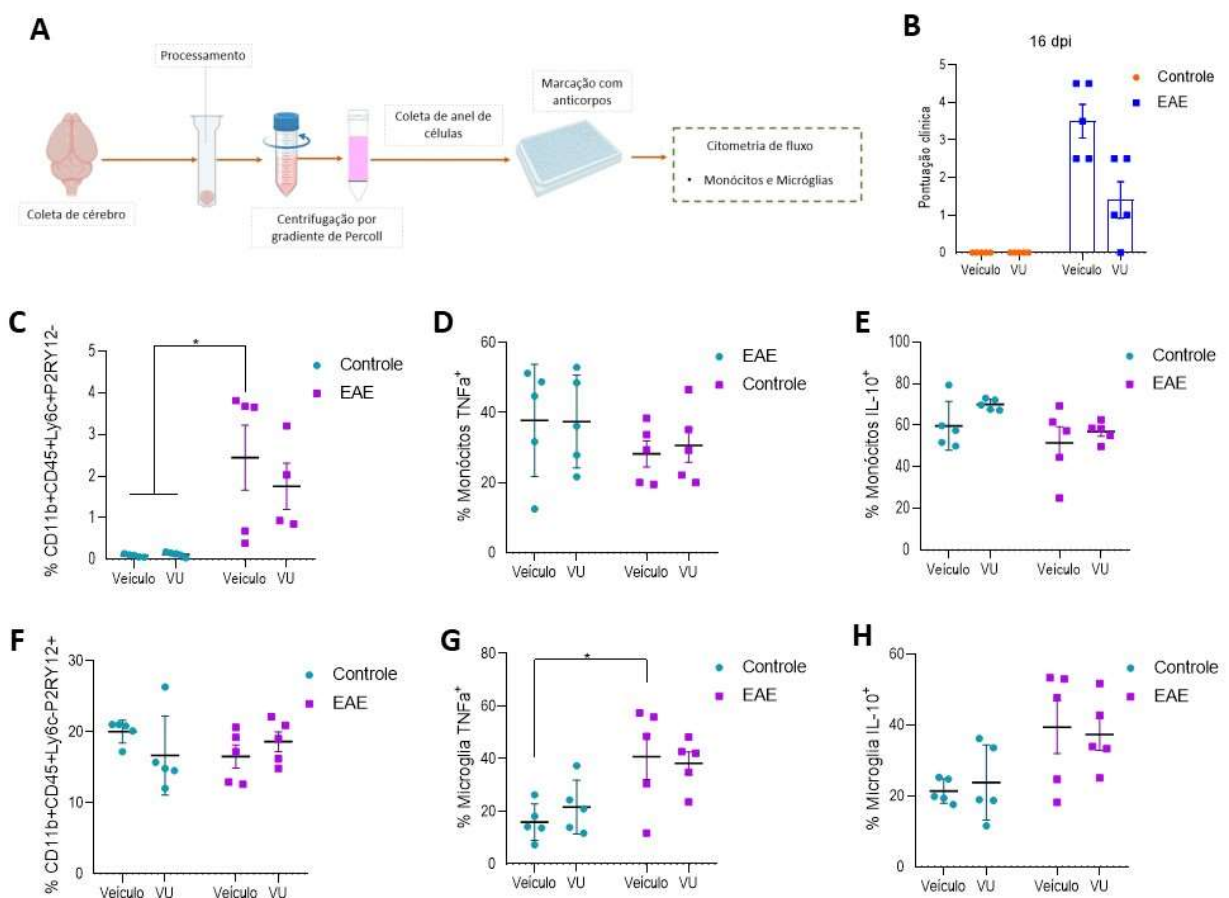


Figura 35 – Micróglia TNF⁺ estão aumentadas no grupo EAE Veículo, mas não no grupo EAE VU. (A) Esquema experimental representando o processamento do tecido cerebral para análise por citometria de fluxo. (B) Pontuação clínica dos animais no 16º dia pós-indução (dpi) da EAE. (C-E) Análise de monócitos (CD11b⁺CD45⁺Ly6c⁺P2RY12⁻), (C) Porcentagem total de monócitos no cérebro. (D) Porcentagem de monócitos TNF⁺. (E) Porcentagem de monócitos IL-10⁺. (F-H) Análise de

micróglia (CD11b⁺CD45⁺Ly6c⁻P2RY12⁺), (F) Porcentagem total de micróglia no cérebro. (G) Porcentagem de micróglia TNF⁺. (H) Porcentagem de micróglia IL-10⁺. Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA Two-way seguida do pós-teste de Tukey, considerando diferenças significativas quando $p < 0,05$. A significância estatística pelo pós-teste de Tukey está indicada por *.

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos do tratamento com VU0409551, um MAP do mGluR5, em parâmetros comportamentais, imunológicos e moleculares do modelo EAE. Nossos principais achados demonstram que o tratamento com VU0409551: I) melhora a severidade da EAE; II) diminui comportamentos semelhantes à ansiedade observados em animais EAE; III) regula negativamente vias celulares relacionadas ao sistema imune que são reguladas positivamente quando a EAE é induzida; IV) normaliza a expressão gênica de marcadores de oligodendrócitos associados a doença que se mostram aumentados pela indução da EAE; V) previne a astrocitose induzida pela EAE; VI) previne o aumento de micróglia e o influxo de monócitos no SNC. Esses achados reforçam o potencial terapêutico do VU0409551 como um modulador imunológico e neuroprotetor na EAE.

Nenhum trabalho anterior avaliou a eficácia de MAPs do mGluR5 no modelo EAE. Entretanto, outros estudos avaliaram a modulação farmacológica do sistema glutamatérgico em modelos de desmielinização e neuroinflamação. No modelo EAE, o uso de antagonistas de receptores NMDA, como amantadina ou memantina, resultou em redução significativa da pontuação clínica máxima e da duração da doença (Sulkowski; Dąbrowska-Bouta; Struzyńska, 2013). Estes achados indicam que a inibição da excitotoxicidade via NMDA pode atenuar sintomas clínicos da EAE (Dąbrowska-Bouta et al., 2015; Sulkowski; Dąbrowska-Bouta; Struzyńska, 2013). Por outro lado, o antagonismo de mGluR5 com MPEP não alterou a pontuação clínica nem a progressão da doença nesses mesmos estudos, sugerindo que a inibição de mGluR5 não é eficiente em modificar o curso clínico da EAE (Dąbrowska-Bouta et al., 2015; Sulkowski; Dąbrowska-Bouta; Struzyńska, 2013). Ao contrário, no modelo cuprizona, a ativação de mGluR5 com CHPG promoveu recuperação funcional e melhora motora, revertendo déficits motores, de equilíbrio e força (Saitta et al., 2021). De forma semelhante ao modelo cuprizona, em lesão cerebral traumática, a ativação de mGluR5 também resultou em melhora significativa dos desfechos motores e cognitivos (Loane et al., 2013). Esses dados sugerem que, diferentemente do antagonismo, a ativação farmacológica de mGluR5 pode favorecer a recuperação funcional em condições de dano ao SNC, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Transtornos neuropsiquiátricos, como ansiedade e depressão, estão frequentemente associados a doenças neurodegenerativas e autoimunes. De fatos, estas são as comorbidades mais comuns na EM e refletem negativamente na qualidade de vida dos pacientes (Marrie et al., 2015; McKay et al., 2018). Entre as opções terapêuticas para estes transtornos, o mGluR5 vem sendo apontado como uma opção interessante (Esterlis et al., 2018, 2022; Krystal et al., 2010; Luessen; Conn, 2022b; Su et al., 2022). No presente trabalho, observamos que o tratamento de animais EAE com VU0409551 resultou em efeitos ansiolíticos, evidenciados pela redução de comportamentos semelhantes à ansiedade em testes comportamentais clássicos, como a caixa claro-escuro e o labirinto em cruz elevado. Os efeitos aqui observados do MAP do mGluR5 corroboram dados da literatura, os quais demonstram que a manipulação farmacológica do mGluR5 pode modular a expressão de comportamentos do tipo ansioso. Por exemplo, a administração de um MAP do mGluR5, o CDPPB, foi capaz de reverter comportamentos do tipo ansioso induzidos por estresse crônico e em modelos de dor (Guo et al., 2018; Li et al., 2023a).

Nossos resultados demonstram ainda que VU0409551 pode ter efeito motivacional, observados de maneira independente da presença de comportamentos do tipo depressivo em animais EAE. Esse perfil é corroborado por achados recentes utilizando outros MAPs do mGluR5, como o CDPPB, onde camundongos submetidos ao estresse social repetido apresentaram comportamentos do tipo depressivo, e a administração aguda de CDPPB (20 mg/kg) foi capaz de atenuar significativamente o comportamento de esquiva social, mesmo em animais que não exibiam déficits marcantes de motivação ou interação social antes do tratamento (Zhang et al., 2024). Em contrapartida, estudos que utilizam o antagonismo de mGluR5, ao exemplo das drogas MTEP E MPEP, demonstram que o bloqueio do receptor pode ter efeitos antidepressivos e ansiolíticos (Belozertseva et al., 2007; Li et al., 2006; Pałucha et al., 2005; Tatarczyńska et al., 2001). Embora os resultados aqui apresentados indiquem que o VU0409551 tenha um efeito ansiolítico, novos estudos utilizando diferentes dosagens e outros tempos de tratamento são necessários para confirmar esses achados.

Nossos resultados mostram que o tratamento com VU0409551 em animais EAE possui efeito imunomodulador periférico, levando à prevenção do aumento de IL-17 e células Th1 no baço. O glutamato, tradicionalmente reconhecido como neurotransmissor central, também atua como importante modulador do sistema

imune, exercendo efeitos diretos sobre células da imunidade inata e adaptativa (Pacheco et al., 2007). Diversas células da periferia expressam receptores de glutamato, incluindo o mGluR5 (Alim et al., 2021; Pacheco et al., 2007). Embora não haja dados diretos de mGluR5 na EAE, a literatura sobre mGluR4 oferece suporte importante para nossos achados. Estudos demonstram que a ativação do mGluR4, por meio de utilização de agonistas ou moduladores alostéricos positivos, tem efeito protetor na periferia no modelo EAE (Fazio et al., 2014). Este receptor pode promover expansão de células Tregs e regular negativamente a resposta Th17 (Gammon et al., 2015). PAMs seletivos de mGluR4 promovem um perfil imunorregulador, com aumento de IL-10 e TGF- β , e induzem tolerância imunológica de longa duração (Volpi et al., 2016). Portanto, a modulação positiva de receptores metabotrópicos de glutamato na periferia pode ser uma estratégia eficaz para controlar a resposta inflamatória em doenças autoimunes.

A maioria dos tratamentos atualmente disponíveis para EM, apesar de eficazes na modulação da resposta imune periférica, apresentam limitações significativas na capacidade de reverter ou modular os prejuízos no SNC (Koudriavtseva et al., 2014; Kowarik et al., 2021). Visto que o VU0409551 é um MAP do mGluR5 com capacidade de penetração cerebral e biodisponibilidade oral (Conde-Ceide et al., 2015) e, considerando esta lacuna terapêutica, nossos resultados indicam o potencial dessa droga em modular diretamente os mecanismos moleculares no SNC. A análise proteômica da medula espinhal revelou alterações moleculares significativas induzidas pela EAE e que foram parcialmente revertidas pelo tratamento com VU0409551. Uma série de proteínas (ex.: C1qc, Irgm1, Psme1, Gbp7, Tgtp1, Serpina3n, Igtp, Arg1, Itgb2, Gbp2b, entre outras) que foram reguladas positivamente nos animais EAE tiveram sua expressão normalizada nos animais EAE que foram tratados com VU0409551. Ademais, os resultados observados no enriquecimento de vias revelam que a indução da EAE regula positivamente vias relacionadas à inflamação, processamento e apresentação de antígenos, sinalizações pró-inflamatórias, respostas imunes inatas e humorais, mielinização, entre outras. Contudo, o tratamento com VU0409551 em animais EAE normalizou estas mesmas vias. Esses resultados sugerem que o VU0409551 possa estar modulando vias celulares específicas afetadas pela EAE e, potencialmente, revertendo algumas das alterações moleculares induzidas pela doença, as quais estão relacionadas principalmente à resposta imune e inflamação. A expressão diferencial promovida pela

indução da EAE neste trabalho está de acordo com análises proteômicas de estudos anteriores, os quais mostram proteínas (Serpina3n, Itgb, C1qb/c, Psme e outras) diferencialmente expressas na medula espinhal relacionadas aos processos do sistema imune em animais EAE (Hasan et al., 2019; Liu et al., 2007).

Não existem estudos no modelo EAE que avaliem o perfil proteômico em animais tratados com algum MAP de mGluR5. Com isso, a fim de interpretar nossos resultados, destacam-se a seguir os possíveis mecanismos subjacentes. Corroborando nossos achados, já foi demonstrado que o mGluR5 pode atuar de forma a suprimir a sinalização pró-inflamatória em células gliais (Spampinato et al., 2018b). Além disso, a ativação do mGluR5 usando um agonista seletivo, o CHPG, inibe a inflamação microglial (Byrnes et al., 2009). Em macrófagos (in-vitro), a expressão de mGluR5 contribui para formação de um fenótipo imunossupressor (Shanshiashvili et al., 2017). A sinalização através do receptor mGluR5 pode impedir a ativação e proliferação de células T e levar à ausência de respostas de células T nos linfonodos, o que pode ser visto como papel imunorregulador (Pacheco et al., 2004, 2007). Na EM, ocorre um aumento difuso na expressão de mGluR5 em astrócitos reativos em lesões (Geurts et al., 2003). Contudo, em relação ao papel ativador ou inibidor de drogas que manipulem este receptor, os dados ainda são conflitantes.

De forma contrastante aos nossos resultados, foi demonstrado que a ativação do mGluR5 pode aumentar a proliferação de astrócitos (Kanumilli; Roberts, 2006). A utilização de PAMs de mGluR5, como CDPPB, VU-29 e ADX47273, potencializou a sinalização do mGluR5 em astrócitos corticais, promovendo aumento da fosforilação de ERK1/2 e da mobilização de cálcio intracelular, processos ligados à regulação da função e da ativação dessas células (Ayala et al., 2009; Liu et al., 2008). A utilização de um PAM de mGluR5 (VU0092273) aumentou o número e reatividade de astrócitos (células GFAP+) em um modelo de isquemia cerebral, o que os autores atribuíram como “efeitos protetores” (Cavallo et al., 2020). Em contradição aos nossos resultados, onde o MAP de mGluR5 demonstra efeitos imunomoduladores benéficos, diversos estudos sugerem que a inibição de mGluR5 pode levar a efeitos benéficos, como diminuição no estado inflamatório e neurotóxico que é observado em doenças neurodegenerativas (Budgett et al., 2022). Dentre os efeitos negativos encontrados na literatura, já foi demonstrado que a ativação do mGluR5 em astrócitos também está associada à progressão da doença de Alzheimer, patologia amiloide e disfunção cognitiva, enquanto sua inibição tem efeito protetor (Yang et al., 2025). Desta forma,

a literatura sugere que a modulação do mGluR5 pode influenciar o perfil inflamatório e a reatividade astrocitária, mas não há relatos de quantificação do número de astrócitos após manipulação farmacológica do receptor em modelos da EM. Assim, embora nossos resultados indiquem uma redução do número de astrócitos em função do tratamento com VU0409551, a literatura disponível se concentra em mudanças funcionais e fenotípicas dessas células, reforçando a necessidade de mais estudos que avaliem quantitativamente esse desfecho em diferentes contextos patológicos.

Nossos resultados demonstraram que o tratamento com VU0409551 reduziu significativamente o número de micróglia reativas e a porcentagem de monócitos infiltrantes no cérebro de camundongos EAE. Também observamos uma correlação positiva entre a gravidade clínica e a quantidade de micróglia, além de uma relação inversa com a complexidade morfológica dessas células, sugerindo que a ativação microglial acompanha a progressão da doença. A ativação microglial é reconhecida como um dos eventos iniciais da EAE, podendo preceder a infiltração linfocitária (Ponomarev; Shriver; Dittel, 2006). Estudos anteriores demonstram que a modulação do mGluR5, tanto por agonistas ortostéricos quanto por MAPs, exerce efeitos anti-inflamatórios sobre a micróglia em diferentes modelos de neuroinflamação, como lesão medular e encefalite viral (Byrnes et al., 2009; Hanak et al., 2019). Em modelos in vitro, essa modulação reduz a produção de mediadores inflamatórios como NO, ROS e TNF- α por micróglia ativadas por LPS, por meio de vias de sinalização distintas, a depender do tipo de agonista, como as vias clássicas PLC/PKC ou a via AKT/GSK3 β /CREB ativada por MAPs (Bhat et al., 2021b; Loane et al., 2013; Qiu et al., 2015). No nosso estudo, a associação entre severidade clínica e aumento de micróglia foi atenuada pelo tratamento com VU0409551, sugerindo que sua ação pode envolver a preservação de um fenótipo microglial menos reativo. Além disso, a redução da infiltração de monócitos possivelmente reflete um impacto na sinalização de quimiocinas como CCL2 (MCP-1), mecanismo já descrito em modelos de neuropatia diabética com ativação de mGluR5 (Kim et al., 2014). Esses achados reforçam o potencial do VU0409551 como agente neuroprotetor, atuando sobre componentes centrais da neuroinflamação na EAE, como micróglia e monócitos, e sustentam a hipótese de que a modulação de mGluR5 pode interferir na progressão clínica da doença.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados obtidos neste estudo demonstram que a utilização de um MAP do mGluR5, o VU0409551, exerce efeitos terapêuticos importantes no modelo EAE. Nossa abordagem, utilizando técnicas diversificadas, mostrou que as ações benéficas do VU vão desde a diminuição da pontuação clínica e comportamentos semelhantes à ansiedade, até alterações neuroimunes importantes, que podem ser mediadas por células periféricas e/ou centrais. Além disso, historicamente, a maioria das pesquisas sobre a EAE se concentraram em avaliar os processos neuroinflamatórios na medula. Porém, o nosso estudo é um entre vários estudos recentes que vem mostrando o papel extremamente importante do córtex na fisiopatologia da EAE. Esta investigação é pioneira em muitos sentidos e é apenas a porta de entrada para novas descobertas envolvendo o receptor mGluR5 e a EM/EAE. Portanto, é essencial que extensas investigações sejam realizadas, a fim de desvendar os mecanismos moleculares por trás da ação desta droga. Além disso, é necessário que as diferentes fases do modelo (pré-clínica, pico e remissão) sejam avaliadas para os diversos parâmetros aqui demonstrados

8 REFERÊNCIAS

ABD-ELRAHMAN, Khaled S. *et al.* **A β oligomers induce pathophysiological mGluR5 signaling in Alzheimer's disease model mice in a sex-selective manner** *Sci. Signal.* [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://stke.sciencemag.org/>>.

ABD-ELRAHMAN, Khaled S.; FERGUSON, Stephen S. G. Noncanonical Metabotropic Glutamate Receptor 5 Signaling in Alzheimer's Disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** Downloaded from www.annualreviews.org. Guest, v. 41, p. 43, 2025.

AHARONI, Rina; EILAM, Raya; ARNON, Ruth. **Astrocytes in multiple sclerosis—essential constituents with diverse multifaceted functions.** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI, 1 jun. 2021.

ALIM, Md Abdul *et al.* Glutamate triggers the expression of functional ionotropic and metabotropic glutamate receptors in mast cells. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 10, p. 2383–2392, 1 out. 2021.

AMIN, Moein; HERSH, Carrie M. **Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics.** *Neurodegenerative Disease Management* Newlands Press Ltd, , 1 fev. 2023a.

AMIN, Moein; HERSH, Carrie M. **Updates and advances in multiple sclerosis neurotherapeutics.** *Neurodegenerative Disease Management* Newlands Press Ltd, , 1 fev. 2023b.

ARONICA, Eleonora *et al.* Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. **European Journal of Neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 2333–2344, 2000.

BAECHER-ALLAN, Clare; KASKOW, Belinda J.; WEINER, Howard L. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. **Neuron**, v. 97, n. 4, p. 742–768, 2018a.

BAECHER-ALLAN, Clare; KASKOW, Belinda J.; WEINER, Howard L. **Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy.** *Neuron* Cell Press, 21 fev. 2018b.

BALU, Darrick T. *et al.* An mGlu5-Positive Allosteric Modulator Rescues the Neuroplasticity Deficits in a Genetic Model of NMDA Receptor Hypofunction in Schizophrenia. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 8, p. 2052–2061, 1 jul. 2016.

BATISTA, Edleusa M. L. *et al.* Orchestrated activation of mGluR5 and CB1 promotes neuroprotection. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, p. 1–17, 2016a.

BATISTA, Edleusa M. L. *et al.* Orchestrated activation of mGluR5 and CB1 promotes neuroprotection. **Molecular Brain**, v. 9, n. 1, 20 ago. 2016b.

BELLANCA, Carlo Maria *et al.* Disease Modifying Strategies in Multiple Sclerosis: New Rays of Hope to Combat Disability? **Current Neuropharmacology**, v. 22, n. 8, p. 1286–1326, 25 jan. 2024a.

BELLANCA, Carlo Maria *et al.* Disease Modifying Strategies in Multiple Sclerosis: New Rays of Hope to Combat Disability? **Current Neuropharmacology**, v. 22, n. 8, p. 1286–1326, 25 Jan. 2024b.

BELOZERTSEVA, I. V. *et al.* Antidepressant-like effects of mGluR1 and mGluR5 antagonists in the rat forced swim and the mouse tail suspension tests. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 172–179, fev. 2007.

BHAT, Shahnawaz A. *et al.* Enhanced Akt/GSK-3 β /CREB signaling mediates the anti-inflammatory actions of mGluR5 positive allosteric modulators in microglia and following traumatic brain injury in male mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 156, n. 2, p. 225–248, 1 jan. 2021a.

BHAT, Shahnawaz A. *et al.* Enhanced Akt/GSK-3 β /CREB signaling mediates the anti-inflammatory actions of mGluR5 positive allosteric modulators in microglia and following traumatic brain injury in male mice. **Journal of Neurochemistry**, v. 156, n. 2, p. 225–248, 1 jan. 2021b.

BINZER, Stefanie *et al.* Disability worsening among persons with multiple sclerosis and depression: A Swedish cohort study. **Neurology**, v. 93, n. 24, p. E2216–E2223, 10 dez. 2019.

BITTNER, Stefan *et al.* Myelin Oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 86, 15 abr. 2014.

BJELOBABA, Ivana *et al.* **Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis.** **Journal of Neuroscience Research** John Wiley and Sons Inc., 1 jun. 2018a.

BJELOBABA, Ivana *et al.* **Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis.** **Journal of Neuroscience Research** John Wiley and Sons Inc., 1 jun. 2018b.

BOUGUIYOUN, Nouhaila *et al.* Anxiety and Depression Assessments in a Mouse Model of Congenital Blindness. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 21 jan. 2022.

BOURIN, Michel; HASCOËT, Martine. **The mouse light/dark box test.** **European Journal of Pharmacology** Elsevier, 28 fev. 2003.

BOWIE, Derek. Ionotropic Glutamate Receptors & CNS Disorders. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 129–143, 2008.

BRONTE, Vincenzo; PITTET, Mikael J. **The spleen in local and systemic regulation of immunity.** **Immunity** Cell Press, 14 nov. 2013.

BROWN, Jessica *et al.* The comparative effects of mGlu5 receptor positive allosteric modulators VU0409551 and VU0360172 on cognitive deficits and signalling in the

sub-chronic PCP rat model for schizophrenia. **Neuropharmacology**, v. 208, 1 maio 2022.

BRUNO, Valeria *et al.* The impact of metabotropic glutamate receptors into active neurodegenerative processes: A “dark side” in the development of new symptomatic treatments for neurologic and psychiatric disorders. **Neuropharmacology**, v. 115, p. 180–192, 2017.

BUDGETT, Rebecca F. *et al.* **Targeting the Type 5 Metabotropic Glutamate Receptor: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases?** **Frontiers in Pharmacology** Frontiers Media S.A., 11 maio 2022.

BUSCH, Ruben *et al.* Effects of p75NTR deficiency on cholinergic innervation of the amygdala and anxiety-like behavior. **Journal of Neurochemistry**, v. 141, n. 3, p. 461–471, 1 maio 2017.

BUTT, Arthur M. *et al.* Metabotropic Glutamate Receptors Protect Oligodendrocytes from Acute Ischemia in the Mouse Optic Nerve. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 9, p. 2468–2478, 1 set. 2017.

BYRNES, Kimberly R. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 activation inhibits microglial associated inflammation and neurotoxicity. **GLIA**, v. 57, n. 5, p. 550–560, 2009.

CAPPER, Erin N. *et al.* MOG35 – 55-induced EAE model of optic nerve inflammation compared to MS, MOGAD and NMOSD related subtypes of human optic neuritis. **Journal of Neuroinflammation**, v. 22, n. 1, p. 102, 7 abr. 2025.

CARAVAGNA, Céline *et al.* Diversity of innate immune cell subsets across spatial and temporal scales in an EAE mouse model. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

CAVALLO, Damiana *et al.* Neuroprotective effects of mGluR5 activation through the PI3K/Akt pathway and the molecular switch of AMPA receptors. **Neuropharmacology**, v. 162, 1 jan. 2020.

CHAPMAN, Caron *et al.* Predictors of progression from a first demyelinating event to clinically definite multiple sclerosis. **Brain Communications**, v. 4, n. 4, 2022.

CHARABATI, Marc *et al.* **Multiple sclerosis: Neuroimmune crosstalk and therapeutic targeting.** **Cell** Elsevier B.V., 30 mar. 2023.

CHEN, Tao *et al.* The selective mGluR5 agonist CHPG protects against traumatic brain injury in vitro and in vivo via ERK and Akt pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 29, n. 4, p. 630–636, abr. 2012.

CHIANG, Vic Shao Chih; PARK, Jin Ho. **Glutamate in Male and Female Sexual Behavior: Receptors, Transporters, and Steroid Independence.** **Frontiers in Behavioral Neuroscience** Frontiers Media S.A., 24 nov. 2020.

CHMIELEWSKA, Natalia; SZYNDLER, Janusz. **Targeting CD20 in multiple sclerosis — review of current treatment strategies**. *Neurologia i Neurochirurgia Polska* Via Medica, 2023.

CHRISTOPOULOS, Arthur; KENAKIN, Terry. **G Protein-Coupled Receptor Allostherism and Complexing**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org>>.

CHUN, Jerold; HARTUNG, Hans Peter. **Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis**. *Clinical Neuropharmacology*, mar. 2010.

CHYLIŃSKA, Magdalena *et al.* Brain Atrophy as an Outcome of Disease-Modifying Therapy for Relapsing-Relapsing Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis International**, v. 2023, p. 1–11, 31 ago. 2023.

CONDE-CEIDE, Susana *et al.* Discovery of VU0409551/JNJ-46778212: An mGlu5 Positive Allosteric Modulator Clinical Candidate Targeting Schizophrenia. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 6, p. 716–720, 11 jun. 2015.

CONSTANTINESCU, Cris S. *et al.* Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 4, p. 1079–1106, 2011a.

CONSTANTINESCU, Cris S. *et al.* Themed Issue: Translational Neuropharmacology-Using Appropriate Animal Models to Guide Clinical Drug Development Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS) LINKED ARTICLES. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1079–1106, 4 fev. 2011b.

CORREALE, Jorge. **The role of microglial activation in disease progression**. *Multiple Sclerosis* SAGE Publications Ltd, 1 set. 2014.

CORREALE, Jorge *et al.* Acting centrally or peripherally: A renewed interest in the central nervous system penetration of disease-modifying drugs in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis and Related Disorders**, v. 56, 1 nov. 2021.

COTSAPAS, Chris; MITROVIC, Mitja. **Genome-wide association studies of multiple sclerosis**. *Clinical and Translational Immunology* John Wiley and Sons Inc., 2018.

CRUPI, Rosalia; IMPELLIZZERI, Daniela; CUZZOCREA, Salvatore. Role of metabotropic glutamate receptors in neurological disorders. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, n. February, p. 1–11, 2019.

DĄBROWSKA-BOUTA, Beata *et al.* The influence of glutamatergic receptor antagonists on biochemical and ultrastructural changes in myelin membranes of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. **Folia Neuropathologica**, v. 53, n. 4, p. 317–326, 2015.

DE SÈZE, Jérôme *et al.* **Anti-CD20 therapies in multiple sclerosis: From pathology to the clinic**. *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 2023.

DEDONI, S. *et al.* **An overall view of the most common experimental models for multiple sclerosis.** *Neurobiology of Disease* Academic Press Inc., 1 ago. 2023.

DENDROU, Calliope A.; FUGGER, Lars; FRIESE, Manuel A. Immunopathology of multiple sclerosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 9, p. 545–558, 2015.

DOBSON, R.; GIOVANNONI, G. **Multiple sclerosis – a review.** *European Journal of Neurology* Blackwell Publishing Ltd, 1 jan. 2019.

DOGRA, Shalini; CONN, P. Jeffrey. **Targeting metabotropic glutamate receptors for the treatment of depression and other stress-related disorders.** *Neuropharmacology* Elsevier Ltd, 15 set. 2021.

DORIA, J. G. *et al.* The mGluR5 positive allosteric modulator, CDPPB, ameliorates pathology and phenotypic signs of a mouse model of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 73, p. 163–173, 1 jan. 2015.

DORIA, Juliana G. *et al.* The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 147, n. 2, p. 222–239, 1 out. 2018a.

DORIA, Juliana G. *et al.* The mGluR5 positive allosteric modulator VU0409551 improves synaptic plasticity and memory of a mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 147, n. 2, p. 222–239, 1 out. 2018b.

EL-BEHI, Mohamed; ROSTAMI, Abdolmohamad; CIRIC, Bogoljub. **Current views on the roles of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, jun. 2010.

ESMAEILZADEH, Abdolreza; MOHAMMADI, Vahid; ELAHI, Reza. **Transforming growth factor β (TGF- β) pathway in the immunopathogenesis of multiple sclerosis (MS); molecular approaches.** *Molecular Biology Reports* Springer Science and Business Media B.V., 1 jul. 2023.

ESTERLIS, Irina *et al.* **Metabotropic Glutamatergic Receptor 5 and Stress Disorders: Knowledge Gained From Receptor Imaging Studies.** *Biological Psychiatry* Elsevier USA, 15 jul. 2018.

ESTERLIS, Irina *et al.* Differential Role of mGluR5 in Cognitive Processes in Posttraumatic Stress Disorder and Major Depression. **Chronic Stress**, v. 6, 2022.

FAROOQI, Nasr; GRAN, Bruno; CONSTANTINESCU, Cris S. **Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis?** *Journal of Neurochemistry*, nov. 2010.

FAZIO, F. *et al.* Switch in the expression of mGlu1 and mGlu5 metabotropic glutamate receptors in the cerebellum of mice developing experimental autoimmune

encephalomyelitis and in autaptic cerebellar samples from patients with multiple sclerosis. **Neuropharmacology**, v. 55, n. 4, p. 491–499, set. 2008.

FAZIO, Francesco *et al.* Cinnabarinic acid, an endogenous agonist of type-4 metabotropic glutamate receptor, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 237–243, 2014.

FERRAGUTI, Francesco *et al.* Activated astrocytes in areas of kainate-induced neuronal injury upregulate the expression of the metabotropic glutamate receptors 2/3 and 5. **Experimental Brain Research**, v. 136, n. 4, p. 1–11, 2001.

FOURNIER, Antoine Philippe *et al.* Single-Cell Transcriptomics Identifies Brain Endothelium Inflammatory Networks in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2023.

FOX, John; WEISBERG, Sanford. **Car: An R Companion to Applied Regression**. Thousand Oaks CA, 2019.

FRANCIS, G. *et al.* Temporal profile of lymphocyte counts and relationship with infections with fingolimod therapy. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 4, p. 471–480, 2014.

FREEDMAN, Mark S. *et al.* Treatment Optimization in MS: Canadian MS Working Group Updated Recommendations. **THE CANADIAN JOURNAL OF NEUROLOGICAL SCIENCES**, v. 40, p. 307–323, maio 2013.

GAMMON, Joshua M. *et al.* Controlled delivery of a metabolic modulator promotes regulatory T cells and restrains autoimmunity. **Journal of Controlled Release**, v. 210, p. 169–178, 30 maio 2015.

GARDNER, Christopher *et al.* Cortical grey matter demyelination can be induced by elevated pro-inflammatory cytokines in the subarachnoid space of MOG-immunized rats. **Brain**, v. 136, n. 12, p. 3596–3608, 2013.

GATTO, Laurent; VANDERAA, Christophe. **QFeatures: Quantitative features for mass spectrometry data**. Disponível em: <<https://orcid.org/0000-0001-7443-5427>>.

GEURTS, J. J. G. *et al.* Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. **Brain**, v. 126, n. 8, p. 1755–1766, 1 ago. 2003.

GHAREGHANI, Majid *et al.* **Hormones in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal models**. **Translational Neuroscience** De Gruyter Open Ltd, 1 jan. 2021.

GOLD, Stefan M. *et al.* **Sex differences in autoimmune disorders of the central nervous system**. **Seminars in Immunopathology** Springer Verlag, 15 mar. 2019.

GONZALEZ-LORENZO, Marien *et al.* Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing-remitting multiple sclerosis: a network meta-analysis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2024, n. 1, 4 jan. 2024.

GOVERMAN, Joan. **Autoimmune T cell responses in the central nervous system**. **Nature Reviews Immunology**, jun. 2009.

GRACE, Peter M. *et al.* Behavioral assessment of neuropathic pain, fatigue, and anxiety in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and attenuation by interleukin-10 gene therapy. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 59, p. 49–54, 1 jan. 2017.

GUAN, Dong Feng *et al.* The mGluR5 Positive Allosteric Modulator CDPBP Inhibits SO₂-Induced Protein Radical Formation and Mitochondrial Dysfunction Through Activation of Akt in Mouse Hippocampal HT22 Cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 35, n. 4, p. 573–583, 1 maio 2015.

GUERRA, Tommaso; IAFFALDANO, Pietro. **A Window into New Insights on Progression Independent of Relapse Activity in Multiple Sclerosis: Role of Therapies and Current Perspective**. **International Journal of Molecular Sciences** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 1 fev. 2025.

GUERRERO, Brooke L.; SICOTTE, Nancy L. **Microglia in Multiple Sclerosis: Friend or Foe?** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 20 mar. 2020.

GUO, Baolin *et al.* Chronic Inflammatory Pain Impairs mGluR5-Mediated Depolarization-Induced Suppression of Excitation in the Anterior Cingulate Cortex. **Cerebral Cortex**, v. 28, n. 6, p. 2118–2130, 1 jun. 2018.

GUO, Hongqiu *et al.* A NMDA-receptor calcium influx assay sensitive to stimulation by glutamate and glycine/D-serine. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

GWAK, Young Seob; HULSEBOSCH, Claire E. Upregulation of Group I metabotropic glutamate receptors in neurons and astrocytes in the dorsal horn following spinal cord injury. **Experimental Neurology**, v. 195, n. 1, p. 236–243, set. 2005.

HAMMOND, Jennetta W. *et al.* Complement-dependent synapse loss and microgliosis in a mouse model of multiple sclerosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, p. 739–750, 1 jul. 2020.

HANAK, Tyler J. *et al.* Positive modulation of mGluR5 attenuates seizures and reduces TNF- α + macrophages and microglia in the brain in a murine model of virus-induced temporal lobe epilepsy. **Experimental Neurology**, v. 311, p. 194–204, 1 jan. 2019.

HASAN, Mahbub *et al.* Quantitative Proteome Analysis of Brain Subregions and Spinal Cord from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice by TMT-Based Mass Spectrometry. **Proteomics**, v. 19, n. 5, 1 mar. 2019.

HE, Yang *et al.* Amyloid β oligomers suppress excitatory transmitter release via presynaptic depletion of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2019.

HELLYER, Shane D. *et al.* Probe dependence and biased potentiation of metabotropic glutamate receptor 5 is mediated by differential ligand interactions in the common allosteric binding site. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, 1 jul. 2020.

HENTER, Ioline D.; PARK, Lawrence T.; ZARATE, Carlos A. **Novel Glutamatergic Modulators for the Treatment of Mood Disorders: Current Status.** **CNS Drugs**Adis, 1 maio 2021.

HOJATI, Zohreh. Multiple Sclerosis - From bench to bedside. **CNS and Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 11, n. 5, p. 495–496, 2017.

HOVELSO, N. *et al.* Therapeutic Potential of Metabotropic Glutamate Receptor Modulators. **Current Neuropharmacology**, v. 10, n. 1, p. 12–48, 2012.

ISINGRINI, Elsa *et al.* Association between repeated unpredictable chronic mild stress (UCMS) procedures with a high fat diet: A model of fluoxetine resistance in mice. **PLoS ONE**, v. 5, n. 4, 2010.

JACOBS, Benjamin Meir *et al.* **Cladribine: mechanisms and mysteries in multiple sclerosis.** **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**BMJ Publishing Group, 1 dez. 2018.

JALKH, Georges *et al.* **Safety of newer disease modifying therapies in multiple sclerosis.** **Vaccines**MDPI AG, 1 jan. 2021.

JELLINGER, Kurt A. **Behavioral disorders in multiple sclerosis: a comprehensive review.** **Journal of Neural Transmission**Springer, 2024a.

JELLINGER, Kurt A. **Depression and anxiety in multiple sclerosis. Review of a fatal combination.** **Journal of Neural Transmission**Springer, 1 ago. 2024b.

JOHNSON, Kenneth P. *et al.* Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: Results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. **Neurology**, v. 45, n. 7, p. 1268–1276, 1995.

KANG, Youra *et al.* BJ-1108, a 6-Amino-2,4,5-trimethylpyridin-3-ol analogue, regulates differentiation of TH1 and TH17 cells to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–11, 2017.

KANUMILLI, Srinivasan; ROBERTS, Peter J. Mechanisms of glutamate receptor induced proliferation of astrocytes. **Glial Cells**, v. 17, n. 0959–4965, ago. 2006.

KARUSSIS, Dimitrios. **Multiple Sclerosis.** [S.l.: S.n.].

KENIGSBUCH, Mor *et al.* A shared disease-associated oligodendrocyte signature among multiple CNS pathologies. **Nature Neuroscience**, v. 25, n. 7, p. 876–886, 1 jul. 2022.

KHOY, Kathy *et al.* **Natalizumab in Multiple Sclerosis Treatment: From Biological Effects to Immune Monitoring.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 24 set. 2020.

KIM, Jennifer; PAVLIDIS, Paul; CIERNIA, Annie Vogel. Development of a High-Throughput Pipeline to Characterize Microglia Morphological States at a Single-Cell Resolution. **eNeuro**, v. 11, n. 7, 1 jul. 2024.

KIM, Roy Y. *et al.* Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 274, n. 1–2, p. 53–61, 2014.

KIPP, Markus *et al.* Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. **Brain Pathology**, v. 27, n. 2, p. 123–137, 2017.

KOCOVSKI, Pece *et al.* Immunomodulation Eliminates Inflammation in the Hippocampus in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, but Does Not Ameliorate Anxiety-Like Behavior. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 10 jun. 2021.

KOROSTIL, M.; FEINSTEIN, Andrew. Anxiety disorders and their clinical correlates in multiple sclerosis patients. **Multiple Sclerosis**, v. 13, n. 1, p. 67–72, jan. 2007.

KOUDRIAVTSEVA, T. *et al.* Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 3, p. 320–326, jun. 2014.

KOWARIK, M. C. *et al.* Differential Effects of Fingolimod and Natalizumab on B Cell Repertoires in Multiple Sclerosis Patients. **Neurotherapeutics**, v. 18, p. 364–377, 2021.

KRAEUTER, Ann Katrin; GUEST, Paul C.; SARNYAI, Zoltán. The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents. *In: Methods in Molecular Biology*. [S.l.]: Humana Press Inc., 2019. v. 1916 p. 69–74.

KRYSTAL, John H. *et al.* **Potential Psychiatric Applications of Metabotropic Glutamate Receptor Agonists and Antagonists.** [S.l.: S.n.].

LASSMANN, Hans. **Multiple sclerosis pathology.** **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine** Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1 mar. 2018.

LASSMANN, Hans. **Pathogenic mechanisms associated with different clinical courses of multiple sclerosis.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 2019.

LAZO-GOMEZ, Rafael *et al.* Mechanisms of neurobehavioral abnormalities in multiple sclerosis: Contributions from neural and immune components. **Clinical Neurophysiology Practice**, v. 4, p. 39–46, 2019.

LENTH, Russell V. **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. 5 abr. 2025.

LI, Xia *et al.* Metabotropic glutamate 5 receptor antagonism is associated with antidepressant-like effects in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 1, p. 254–259, 2006.

LI, Xin *et al.* mGluR5 in hippocampal CA1 pyramidal neurons mediates stress-induced anxiety-like behavior. **Neuropsychopharmacology**, v. 48, n. 8, p. 1164–1174, 1 jul. 2023a.

LI, Zhenghao *et al.* Nanoparticulate MgH₂ ameliorates anxiety/depression-like behaviors in a mouse model of multiple sclerosis by regulating microglial polarization and oxidative stress. **Journal of Neuroinflammation**, v. 20, n. 1, 1 dez. 2023b.

LIDDELOW, Shane A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature**, v. 541, n. 7638, p. 481–487, 2017.

LIU, Chen Yue *et al.* Saikosaponin D exerts antidepressant effect by regulating Homer1-mGluR5 and mTOR signaling in a rat model of chronic unpredictable mild stress. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 17, n. 1, 1 dez. 2022.

LIU, F. *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 modulates calcium oscillation and innate immune response induced by lipopolysaccharide in microglial cell. **Neuroscience**, v. 281, n. September, p. 24–34, 2014.

LIU, Tong *et al.* Identification of differentially expressed proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by proteomic analysis of the spinal cord. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 7, p. 2565–2575, jul. 2007.

LOANE, David J. *et al.* Activation of metabotropic glutamate receptor 5 modulates microglial reactivity and neurotoxicity by inhibiting NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 23, p. 15629–15639, 5 jun. 2009.

LOANE, David J. *et al.* Activation of mGluR5 and inhibition of NADPH oxidase improves functional recovery after traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 5, p. 403–412, 1 mar. 2013.

LUBLIN, Fred D. *et al.* How patients with multiple sclerosis acquire disability. **Brain**, v. 145, n. 9, p. 3147–3161, 1 set. 2022.

LUDWIN, Samuel K. *et al.* **Astrocytes in multiple sclerosis**. Multiple Sclerosis SAGE Publications Ltd, 1 ago. 2016.

LUESSEN, Deborah J.; CONN, P. Jeffrey. Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors as Novel Therapeutics for Neuropsychiatric Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 630–661, 1 jul. 2022a.

LUESSEN, Deborah J.; CONN, P. Jeffrey. Allosteric Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors as Novel Therapeutics for Neuropsychiatric Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 74, n. 3, p. 630–661, 1 jul. 2022b.

LUYT, Karen; VARADI, Aniko; MOLNAR, Elek. Functional metabotropic glutamate receptors are expressed in oligodendrocyte progenitor cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 84, n. 6, p. 1452–1464, mar. 2003.

MARCHETTI, Luca; ENGELHARDT, Britta. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. **Vascular Biology**, v. 2, n. 1, p. H1–H18, 20 mar. 2020.

MARIKI, Aliakbar *et al.* Antigen B modulates anti-inflammatory cytokines in the EAE model of multiple sclerosis. **Brain and Behavior**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.

MARRIE, Ruth Ann *et al.* **On behalf of the CIHR Team in the Epidemiology and Impact of Comorbidity on Multiple Sclerosis Differences in the burden of psychiatric comorbidity in MS vs the general population.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.statcan.gc.ca/tables->>.

MARTINSEN, Vebjørn; KURSULA, Petri. **Multiple sclerosis and myelin basic protein: insights into protein disorder and disease.** **Amino Acids** Springer, 1 jan. 2022.

MATLOUBIAN, Mehrdad *et al.* Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. **Nature**, v. 427, p. 355–359, 22 jan. 2004.

MATTHEWS, Paul M. Chronic inflammation in multiple sclerosis — seeing what was always there. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 10, p. 582–593, 2019.

MCCOMBE, Pamela A.; GREER, Judith M. Effects of biological sex and pregnancy in experimental autoimmune encephalomyelitis: It's complicated. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 28 nov. 2022.

MCEWEN, Bruce S.; NASCA, Carla; GRAY, Jason D. **Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex.** **Neuropsychopharmacology** Nature Publishing Group, 1 jan. 2016.

MCGINLEY, Aoife M. *et al.* Th17 cells, $\gamma\delta$ T cells and their interplay in EAE and multiple sclerosis. **Journal of Autoimmunity**, v. 87, p. 97–108, 2018.

MCKAY, Kyla A. *et al.* Psychiatric comorbidity is associated with disability progression in multiple sclerosis. **Neurology**, v. 90, n. 15, p. e1316–e1323, 10 abr. 2018.

MELANCON, Bruce J. *et al.* **Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: Theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 23 fev. 2012.

MOLINA-GONZALEZ, Irene; MIRON, Veronique E. Astrocytes in myelination and remyelination. *Neuroscience Letters*, v. 713, p. 134532, 2019.

MONTALBAN, Xavier *et al.*ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, v. 24, n. 2, p. 96–120, 1 fev. 2018.

MORGAN, B. Paul; GOMMERMAN, Jennifer L.; RAMAGLIA, Valeria. **An “Outside-In” and “Inside-Out” Consideration of Complement in the Multiple Sclerosis Brain: Lessons From Development and Neurodegenerative Diseases.** *Frontiers in Cellular Neuroscience* Frontiers Media S.A., 7 jan. 2021.

NATHOO, Nabeela *et al.* **Imaging phenotypic differences in multiple sclerosis: at the crossroads of aging, sex, race, and ethnicity.** *Frontiers in Global Women’s Health* Frontiers Media SA, 2024.

NICOLETTIA, F. Metabotropic glutamate receptors: From the workbench to the bedside. *Bone*, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2008.

NISWENDER, Colleen M.; CONN, P. Jeffrey. **Metabotropic glutamate receptors: Physiology, pharmacology, and disease.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 10 fev. 2010.

NIU, Yingying *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 regulates synaptic plasticity in a chronic migraine rat model through the PKC/NR2B signal. *Journal of Headache and Pain*, v. 21, n. 1, 1 dez. 2020.

O’CONNOR, Richard A. *et al.* **Cutting Edge Cutting Edge Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 1.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.jimmunol.org>.

OH, Jiwon; BAR-OR, Amit. **Emerging therapies to target CNS pathophysiology in multiple sclerosis.** *Nature Reviews Neurology* Nature Research, 1 ago. 2022.

OLEJNIK, Piotr *et al.* **Multiple sclerosis: a narrative overview of current pharmacotherapies and emerging treatment prospects.** *Pharmacological Reports* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 out. 2024a.

OLEJNIK, Piotr *et al.* **Multiple sclerosis: a narrative overview of current pharmacotherapies and emerging treatment prospects.** *Pharmacological Reports* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 1 out. 2024b.

PACHECO, Rodrigo *et al.* Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 32, p. 33352–33358, 6 ago. 2004.

PACHECO, Rodrigo *et al.* Role of glutamate on T-cell mediated immunity. **Journal of Neuroimmunology**, v. 185, n. 1–2, p. 9–19, abr. 2007.

PAŁUCHA, Agnieszka *et al.* Potential antidepressant-like effect of MTEP, a potent and highly selective mGluR5 antagonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 4, p. 901–906, ago. 2005.

PATSOPOULOS, Nikolaos A. *et al.* Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. **Science**, v. 365, n. 6460, 27 set. 2019.

PERES, Diulle Spat *et al.* **Prevalence of depression and anxiety in the different clinical forms of multiple sclerosis and associations with disability: A systematic review and meta-analysis.** **Brain, Behavior, and Immunity – Health** Elsevier Inc., 1 out. 2022.

PETERLIK, Daniel; J. FLOR, Peter; USCHOLD-SCHMIDT, Nicole. The Emerging Role of Metabotropic Glutamate Receptors in the Pathophysiology of Chronic Stress-Related Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 14, n. 5, p. 514–539, 2016.

PLANAS-FONTÁNEZ, Talia M.; DREYFUS, Cheryl F.; SAITTA, Kyle S. Reactive Astrocytes as Therapeutic Targets for Brain Degenerative Diseases: Roles Played by Metabotropic Glutamate Receptors. **Neurochemical Research**, v. 45, n. 3, p. 541–550, 2020.

PONATH, Gerald; PARK, Calvin; PITT, David. The role of astrocytes in multiple sclerosis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. FEB, p. 1–12, 2018.

PONOMAREV, Eugene D.; SHRIVER, Leah P.; DITTEL, Bonnie N. **CD40 Expression by Microglial Cells Is Required for Their Completion of a Two-Step Activation Process during Central Nervous System Autoimmune Inflammation** **The Journal of Immunology**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/176/3/1402/1217661/1402.pdf>>.

PROCACCINI, Claudio *et al.* **Animal models of Multiple Sclerosis.** **European Journal of Pharmacology** Elsevier B.V., 15 jul. 2015.

QIU, Jun Ling *et al.* The selective mGluR5 agonist CHPG attenuates SO₂-induced oxidative stress and inflammation through TSG-6/NF-κB pathway in BV2 microglial cells. **Neurochemistry International**, v. 85–86, p. 46–52, 2015.

R CORE, Team. **R: A Language and Environment for Statistical.** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, 2024.

RABCHEVSKY, Alexander G. *et al.* **Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis** **Brain Research**. [S.l.: S.n.].

RANSOHOFF, Richard M. Animal models of multiple sclerosis: The good, the bad and the bottom line. **Nature Neuroscience**, v. 15, n. 8, p. 1074–1077, ago. 2012.

REINER, Andreas; LEVITZ, Joshua. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**, v. 98, n. 6, p. 1080–1098, 2018.

RIBEIRO, Fabiola M. *et al.* Metabotropic glutamate receptors and neurodegenerative diseases. **Pharmacological Research**, v. 115, p. 179–191, 2017.

RIBEIRO, Fabiola M.; PIRES, Rita G. W.; FERGUSON, Stephen S. G. Huntington's disease and group I metabotropic glutamate receptors. **Molecular Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 1–11, 2011.

RIBEIRO, Roberta *et al.* Chronic hyperpalatable diet induces impairment of hippocampal-dependent memories and alters glutamatergic and fractalkine axis signaling. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2023.

RITCHIE, Matthew E. *et al.* Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47, 6 jan. 2015.

ROBINSON, Andrew P. *et al.* The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS. utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *In: Handbook of Clinical Neurology*. [S.l.]: Elsevier B.V., 2014. v. 122 p. 173–189.

RONCHI, Francesca *et al.* Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1 β production by myeloid cells. **Nature Communications**, v. 7, 18 maio 2016.

ROOK, Jerri M. *et al.* Biased mGlu5-Positive Allosteric Modulators Provide In Vivo Efficacy without Potentiating mGlu5 Modulation of NMDAR Currents. **Neuron**, v. 86, n. 4, p. 1029–1040, 20 maio 2015.

SAITTA, Kyle S. *et al.* CHPG enhances BDNF and myelination in cuprizone-treated mice through astrocytic metabotropic glutamate receptor 5. **Glia**, n. December 2020, p. 1–16, 2021.

SARNO, Erika; MOESER, Adam J.; ROBISON, Alfred J. Neuroimmunology of depression. *In: Advances in Pharmacology*. [S.l.]: Academic Press Inc., 2021. v. 91 p. 259–292.

SAVALL, Anne Suély Pinto *et al.* Eugenia uniflora Effects on the Depressive-like Behavior of MPTP-Exposed Female Rats: Apoptosis and α -Synuclein Modulation. **Brain Sciences**, v. 15, n. 1, 1 jan. 2025.

SCHERLINGER, Marc *et al.* **Worldwide trends in all-cause mortality of autoimmune systemic diseases between 2001 and 2014. Autoimmunity Reviews** Elsevier B.V., 1 jun. 2020.

SCHNEIDER-HOHENDORF, Tilman *et al.* VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 9, p. 1833–1846, 2014.

SCHREMPF, Wiebke; ZIEMSEN, Tjalf. **Glatiramer acetate: Mechanisms of action in multiple sclerosis. Autoimmunity Reviews**, ago. 2007.

SENGMANY, Kathy *et al.* Differential contribution of metabotropic glutamate receptor 5 common allosteric binding site residues to biased allosteric agonism. **Biochemical Pharmacology**, v. 177, 1 jul. 2020.

SHANSHIASHVILI, Lali *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 may be involved in macrophage plasticity. **Biological Research**, v. 50, n. 1, p. 1–7, 2017.

SHAPIRO, Sarah *et al.* The “Immunological-Synapse” at its APC side in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis: Modulation by interferon- β . **Journal of Neuroimmunology**, v. 144, n. 1–2, p. 116–124, 2003.

SOLOMON, Andrew J. *et al.* **Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: an updated consensus approach. The Lancet Neurology** Elsevier Ltd, 1 ago. 2023.

SPAMPINATO, Simona Federica *et al.* Metabotropic glutamate receptors in glial cells: A new potential target for neuroprotection? **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. November, p. 1–13, 2018a.

SPAMPINATO, Simona Federica *et al.* **Metabotropic glutamate receptors in glial cells: A new potential target for neuroprotection? Frontiers in Molecular Neuroscience** Frontiers Media S.A., 13 nov. 2018b.

SPAMPINATO, Simona Federica *et al.* **Metabotropic glutamate receptors in glial cells: A new potential target for neuroprotection? Frontiers in Molecular Neuroscience** Frontiers Media S.A., 13 nov. 2018c.

STANSLEY, Branden J.; CONN, P. Jeffrey. **Neuropharmacological Insight from Allosteric Modulation of mGlu Receptors. Trends in Pharmacological Sciences** Elsevier Ltd, 1 abr. 2019.

SU, Li Da *et al.* **Group 1 Metabotropic Glutamate Receptors in Neurological and Psychiatric Diseases: Mechanisms and Prospective. Neuroscientist** SAGE Publications Inc., 1 out. 2022.

SULKOWSKI, Grzegorz; DĄBROWSKA-BOUTA, Beata; STRUZYŃSKA, Lidia. Modulation of neurological deficits and expression of glutamate receptors during experimental autoimmune encephalomyelitis after treatment with selected antagonists of glutamate receptors. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

TARRANTS, M. *et al.* The Impact of Comorbid Depression on Adherence to Therapy for Multiple Sclerosis. **Multiple Sclerosis International**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

TASSONI, Alessia *et al.* The astrocyte transcriptome in EAE optic neuritis shows complement activation and reveals a sex difference in astrocytic C3 expression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

TATARCZYŃSKA, Ewa *et al.* Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of MPEP, a potent, selective and systemically active mGlu5 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 7, p. 1423–1430, 2001.

TITUS, Haley E. *et al.* **Pre-clinical and Clinical Implications of “Inside-Out” vs. “Outside-In” Paradigms in Multiple Sclerosis Etiopathogenesis.** **Frontiers in Cellular Neuroscience** Frontiers Media S.A., 27 out. 2020.

TONN EISINGER, Katherine R. *et al.* **Interactions between estrogen receptors and metabotropic glutamate receptors and their impact on drug addiction in females.** **Hormones and Behavior** Academic Press Inc., 1 ago. 2018.

TSELIS, Alex; KHAN, Omar; LISAK, Robert P. **E X P E R T O P I N I O N** Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis **Neuropsychiatric Disease and Treatment.** [S.l.: S.n.].

VAN EGMOND, E. E. A. *et al.* Work difficulties in people with multiple sclerosis: The role of anxiety, depression and coping. **Multiple Sclerosis Journal - Experimental, Translational and Clinical**, v. 8, n. 3, 1 jul. 2022.

VASILEIOU, Eleni S.; FITZGERALD, Kathryn C. **Multiple Sclerosis Pathogenesis and Updates in Targeted Therapeutic Approaches.** **Current Allergy and Asthma Reports** Springer, 1 set. 2023.

VIDAL-ITRIAGO, Andrés *et al.* **Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS.** **Frontiers in Immunology** Frontiers Media S.A., 19 out. 2022.

VOLPI, Claudia *et al.* Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptor 4 activates IDO1-dependent, immunoregulatory signaling in dendritic cells. **Neuropharmacology**, v. 102, p. 59–71, 2016.

WALDNER, Hanspeter *et al.* Fulminant spontaneous autoimmunity of the central nervous system in mice transgenic for the myelin proteolipid protein-specific T cell receptor. **Immunology**, v. 97, p. 3412–3417, 28 mar. 2000.

WALLIN, Mitchell T. *et al.* Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 18, n. 3, p. 269–285, 2019.

WALTON, Clare *et al.* Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 26, n. 14, p. 1816–1821, 1 dez. 2020.

WANG, Lifeng; WANG, Fu Sheng; GERSHWIN, M. Eric. **Human autoimmune diseases: A comprehensive update.** *Journal of Internal Medicine* Blackwell Publishing Ltd, 1 out. 2015.

WEERASINGHE-MUDIYANSELAGE, Poornima D. E. *et al.* Understanding the spectrum of non-motor symptoms in multiple sclerosis. **Neural Regeneration Research**, v. 19, n. 1, p. 84–91, jan. 2024.

WHITE, Carmel Parker; WHITE, Mark B.; RUSSELL, Candyce S. **Invisible and Visible Symptoms of Multiple Sclerosis: Which Are More Predictive of Health Distress?** [*S.l.: S.n.*].

WINDER, Danny G.; CONN, P. Jeffrey. **Mini-Review Roles of Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Function and Glial-Neuronal Communication** *Journal of Neuroscience Research*. [*S.l.: S.n.*].

WITKIN, Jeffrey M.; PANDEY, Kamal P.; SMITH, Jodi L. Clinical investigations of compounds targeting metabotropic glutamate receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 219, 1 set. 2022.

WOLFENSOHN, Sarah *et al.* Reducing suffering in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 67, n. 3, p. 169–176, maio 2013.

WU, Tianzhi *et al.* cluster Profiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **Innovation**, v. 2, n. 3, 28 ago. 2021.

XIA, Cong Yuan *et al.* Connexins in oligodendrocytes and astrocytes: Possible factors for demyelination in multiple sclerosis. **Neurochemistry International**, v. 136, n. January, p. 104731, 2020.

XIAO, Junhua. **Thirty years of BDNF study in central myelination: From biology to therapy.** *Journal of Neurochemistry* John Wiley and Sons Inc, 1 nov. 2023.

YOSHIZAKI, Kaichi; ASAI, Masato; HARA, Taichi. High-fat diet enhances working memory in the y-maze test in male c57bl/6j mice with less anxiety in the elevated plus maze test. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1–9, 1 jul. 2020.

YU, Hongchen *et al.* **The “Dialogue” Between Central and Peripheral Immunity After Ischemic Stroke: Focus on Spleen.** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., 16 dez. 2021.

ZHANG, Liangui *et al.* Post-stress Social Interaction and 3-Cyano-N-(1,3-Diphenyl-1H-Pyrazol-5-yl) Benzamide Treatment Attenuate Depressive-like Behavior Induced by Repeated Social Defeat Stress. **Neuroscience**, v. 538, p. 11–21, 6 fev. 2024.

ZHANG, Ya Nan *et al.* Metabotropic glutamate receptor 5 inhibits α -synuclein-induced microglia inflammation to protect from neurotoxicity in Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, 1 dez. 2021.

9 ANEXOS

9.1 Tabelas de dados obtidos através de espectrometria de massas

Tabela 5 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo Controle VU e Controles Veículo

Comparação Controle VU vs Controle Veículo			
Código de gene	Nomes das proteínas	Log2 Fold Change	p ajustado
Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	-2,685373246	0,042476629
Myh6	Myosin-6	-2,476243496	0,000563932
Myl3	Myosin light chain 3	-2,040796751	0,00115738
Myl2	Myosin regulatory light chain 2,	-1,839477228	0,015118282
Col6a1	Collagen alpha-1(VI) chain	-1,25472195	0,041785487
Dcn	Neuronal migration protein doublecortin	-1,214794534	0,045477697
Col6a3	Decorin (Bone proteoglycan II) (PG-S2) (PG40)	-1,10675524	0,016495141
Mrpl28	Large ribosomal subunit protein bL28m	1,248603321	0,004578073
Arl8a	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	2,158883948	0,013783156
Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	-2,685373246	0,042476629
Myh6	Myosin-6	-2,476243496	0,000563932

Tabela 6 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo EAE Veículo e Controles Veículo

Comparação EAE Veículo vs Controle Veículo			
Código de gene	Nomes das proteínas	Log2 Fold Change	p ajustado
Lrg1	Leucine-rich HEV glycoprotein,	3,150676081	0,000315205
Serpina3i	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor	2,974019238	0,010218467
Serpina3g	Serine protease inhibitor A3G (Serpina A3G)	2,911144341	0,009418847
Serpina3n	Serine protease inhibitor A3N (Serpina A3N)	2,889020127	0,00115738
Tapbp	Tapasin (TPN) (TPSN)	2,829368612	0,000704831
Tgtp1	T-cell-specific guanine nucleotide triphosphate-binding protein 1	2,791533294	0,000972883
Hpx	Hemopexin	2,647155924	0,015118282
Igtp	Immunity-related GTPase family M protein 3	2,62336651	0,004040281
Gbp2	Guanylate-binding protein	2,622416231	0,01011021
Ifi47	IRG-type G domain-containing protein	2,599476669	0,029114665
Arg1	Arginase-1	2,574411401	0,040673247
Cbln1	Cerebellin-1 (Brain protein D3)	2,559213101	0,000451744
C1qb	Complement C1q subcomponent subunit B	2,499415271	0,000563932
Itgb5	Integrin beta-5	2,455301315	0,000451744

Itgb7	Integrin beta-7	2,455301315	0,000451744
Kng2	Kininogen 2	2,424010758	0,000641341
Orm1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	2,422084969	0,008100784
Iigp1c	Interferon inducible GTPase 1C	2,421079972	0,032987573
Ncf2	Neutrophil cytosol factor 2	2,406539911	0,006372864
Kng1	Kininogen-1	2,375882103	0,000972883
Serpina3k	Serine protease inhibitor A3K	2,35046385	0,015506441
H2-Q10	H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	2,34668518	0,01863346
H2-Q4	Histocompatibility 2, Q region locus 4	2,34668518	0,01863346
H2-Q6	Class Ib MHC antigen Qa-2	2,34668518	0,01863346
H2-Q8	H-2 class I histocompatibility antigen, Q8 alpha chain	2,34668518	0,01863346
H2-Q7	H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain	2,34668518	0,01863346
Tap1	Antigen peptide transporter 1	2,344321473	0,00954352
Gbp10	Guanylate-binding protein 10	2,333291625	0,002177315
Gbp6	Guanylate-binding protein 6	2,333291625	0,002177315
C3	Complement C3	2,312657847	0,00115738
S100a8	Protein S100-A8	2,312347261	0,033747769
Uba7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	2,301583383	0,006581122
H2-L	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain	2,29716744	0,007158285
Hp	Haptoglobin	2,276661164	0,017603921
Serpina3m	Serine protease inhibitor A3M	2,273053433	0,023893617
Rac2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	2,268153514	0,007158285
Fgb	Fibrinogen beta chain	2,229167475	0,000641341
Fermt3	Fermitin family homolog 3	2,21796236	0,000563932
Pzp	Pregnancy zone protein	2,181869478	0,000563932
Gbp7	Guanylate-binding protein 7	2,18119657	0,000120958
Arhgdib	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	2,167212249	0,003537243
Alox5ap	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	2,148241874	0,001126599
Irgm1	Immunity-related GTPase family M protein 1	2,139364554	9,63319E-05
H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain	2,12484044	0,004659666
S100a9	Protein S100-A9	2,107826073	0,040457534
Trf	Serotransferrin	2,087885218	0,005011332
Inhca	Inhibitor of carbonic anhydrase	2,013240434	0,000451744
B2m	Beta-2-microglobulin	2,005787525	0,005223593
Fgg	Fibrinogen gamma chain	1,965176493	0,005341632
Psmb10	Proteasome subunit beta type-10	1,943039499	0,009205461
Itih2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	1,941737526	0,004040281
Fga	Fibrinogen alpha chain	1,909823977	0,012939713
Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,904852722	0,043468177
Ifit3b	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3B	1,904852722	0,043468177

Itgb2	Integrin beta-2	1,904197343	0,001452445
Hmgb2	High mobility group protein B2	1,901345883	0,019187246
F13a1	Coagulation factor XIII A chain	1,900873857	0,001786761
C4b	Complement C4-B	1,895044477	0,006293992
Ces1a	Carboxylic ester hydrolase	1,882764425	0,01011021
Ces1b	Carboxylic ester hydrolase	1,882764425	0,01011021
Ces1d	Carboxylesterase 1D	1,882764425	0,01011021
Ces1g	Liver carboxylesterase 1	1,882764425	0,01011021
Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2	1,864554601	0,020052065
Apoa1	Apolipoprotein A-I	1,816235465	0,011872889
Hcls1	Hematopoietic lineage cell-specific protein	1,789860702	0,025160691
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1,762727469	0,000451744
Samhd1	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	1,747595616	0,000451744
Gc	Vitamin D-binding protein	1,740179854	0,009805687
Lgals3	Galectin-3	1,721366762	0,000563932
Serpina1d	Alpha-1-antitrypsin 1-4	1,715147361	0,016831697
Hexb	Beta-hexosaminidase subunit beta	1,709182662	0,011093869
Ces1c	Carboxylesterase 1C	1,649468388	0,004055996
Mrpl28	Large ribosomal subunit protein bL28m	1,617716707	0,004578073
C1qc	Complement C1q subcomponent subunit C	1,57564402	9,63319E-05
Gbp5	Guanylate-binding protein 5	1,563228772	0,006482731
Psme2	Proteasome activator complex subunit 2	1,541217529	0,000563932
Preb	Guanine nucleotide-exchange factor SEC12	1,528976011	0,045477697
Ncf1	Neutrophil cytosol factor 1	1,527742988	0,006444847
Rnf213	E3 ubiquitin-protein ligase	1,527016318	0,029813817
Alb	Albumin	1,484912158	0,035715264
Hspb1	Heat shock protein beta-1	1,463675806	0,015330857
Gbp2b	Guanylate-binding protein 1	1,451645907	0,001446777
Hrg	Histidine-rich glycoprotein	1,444370945	0,005244585
Plg	Plasminogen	1,436918427	0,000451744
Tgm2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	1,408607938	0,022779228
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	1,377293077	0,045477697
Lgmn	Legumain	1,357161167	0,000445108
Apoa4	Apolipoprotein A-IV	1,342409742	0,026060566
Fn1	Fibronectin	1,340638588	0,006581122
Psme1	Proteasome activator complex subunit 1	1,335615898	0,000234158
A2m	Alpha-2-macroglobulin-P	1,272205612	0,000228064
Psmb7	Proteasome subunit beta type-7	1,249068122	0,025561033
H1f1	Histone H1.1	1,193790526	0,032987573
Ptx3	Pentraxin-related protein PTX3	1,191044631	0,039026547

Igfbp7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	1,161602474	0,000563932
Mrps34	Small ribosomal subunit protein mS34	1,146703026	0,000343686
Myo9b	Unconventional myosin-IXb	1,139036342	0,014811636
Klk6	Kallikrein-1	1,121826234	0,002352477
Tagln2	Transgelin-2	1,117213541	0,01011021
Clic1	Chloride intracellular channel protein 1	1,066208919	0,000571184
Itih3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	1,058658232	0,025160691
Flna	Filamin-A	1,044227841	0,031000311
Lcp1	Lymphocyte cytosolic protein 1	1,035532443	0,000445108
Gatm	Glycine amidinotransferase, mitochondrial	1,025305395	0,000462525
Xaf1	XIAP-associated factor 1	1,016787474	0,019187246
Glpr2	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	1,011700251	0,00115738
Nid1	Nidogen-1	-1,136980691	0,045801253
Cd151	CD151 antigen	-1,150380435	0,032505659
Myl3	Myosin light chain 3	-1,303357532	0,00115738
Drp2	Dystrophin-related protein 2	-1,353798513	0,033747769
Col6a2	Collagen alpha-2(VI) chain	-1,395759352	0,032505659
Dcn	Neuronal migration protein doublecortin	-1,856896122	0,045477697
Col6a3	Decorin (Bone proteoglycan II) (PG-S2) (PG40)	-1,963117097	0,016495141
Myh6	Myosin-6	-2,003456842	0,000563932
Col6a1	Collagen alpha-1(VI) chain	-2,034570909	0,041785487
Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	-2,070115053	0,042476629
Myl2	Myosin regulatory light chain 2	-2,165614383	0,015118282

Tabela 7 – Lista de proteínas diferencialmente abundantes (DAPs) na comparação entre grupo EAE VU e EAE Veículo

Comparação EAE VU vs EAE Veículo			
Código de gene	Nomes das proteínas	Log2 Fold Change	p ajustado
Arl8a	ADP-ribosylation factor-like protein 8A	1,355580807	0,013783156
Dcn	Neuronal migration protein doublecortin	1,004142105	0,045477697
Hexb	Beta-hexosaminidase subunit beta	-1,000375912	0,011093869
Podxl2	Podocalyxin-like protein 2	-1,001214633	0,024731391
Igfbp7	Insulin-like growth factor-binding protein 7	-1,014192842	0,000563932
Cpsf4	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 4	-1,041126114	0,045492898
Snx4	Sorting nexin-4	-1,04490569	0,010663105
Lgmn	Legumain	-1,045681757	0,000445108
Stoml2	Stomatin-like protein 2, mitochondrial	-1,04839476	0,000563932
Flna	Filamin-A	-1,057819875	0,031000311
Clic1	Chloride intracellular channel protein 1	-1,068325776	0,000571184

Gbf1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1	-1,070657219	0,032987573
Dnah17	Dynein axonemal heavy chain 17	-1,07340423	0,000445108
C1qc	Complement C1q subcomponent subunit C	-1,091728672	9,63319E-05
Tagln2	Transgelin-2	-1,092396733	0,01011021
Wbp2	WW domain-binding protein 2	-1,104766174	0,006581122
Ncf1	Neutrophil cytosol factor 1	-1,109406822	0,006444847
Gna14	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-14	-1,111447246	0,032987573
Lcp1	Plastin-2	-1,133035136	0,000445108
Tmx2	Thioredoxin-related transmembrane protein 2	-1,149204927	0,018765921
Scyl2	SCY1-like protein 2	-1,157929064	0,000234158
H1f1	Histone H1.1	-1,158535436	0,032987573
Ace	Angiotensin-converting enzyme	-1,184053777	0,000228064
Serpinb6d	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6d	-1,185241453	0,005998431
Fn1	Fibronectin	-1,185459076	0,006581122
Acsf3	Malonate--CoA ligase ACSF3	-1,238677097	0,003695818
Tgm2	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2	-1,243847129	0,022779228
Ttc38	Tetratricopeptide repeat protein 38	-1,268343734	0,000821987
Plg	Plasminogen	-1,281992225	0,000451744
Gbp2b	Guanylate-binding protein 1	-1,283779363	0,001446777
Ckmt2	Creatine kinase S-type, mitochondrial	-1,302389616	0,042476629
Ahsg	Alpha-2-HS-glycoprotein	-1,320660558	0,045477697
Mrps34	Small ribosomal subunit protein mS34	-1,323689386	0,000343686
Cpsf3	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	-1,34872791	0,041046242
Gbp5	Guanylate-binding protein 5	-1,349741307	0,006482731
Skic2	Superkiller complex protein 2	-1,357373776	0,000639137
Psme2	Proteasome activator complex subunit 2	-1,364536592	0,000563932
Rnf213	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	-1,378896076	0,029813817
Psme1	Proteasome activator complex subunit 1	-1,402429874	0,000234158
Cdh4	Cadherin-4	-1,426639639	0,029655095
Apoa4	Apolipoprotein A-IV	-1,442153609	0,026060566
Hspb1	Heat shock protein beta-1	-1,448828093	0,015330857
Pigu	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class U protein	-1,460098622	6,82065E-05
S100a9	Protein S100-A9	-1,554635416	0,040457534
Hcls1	Hematopoietic lineage cell-specific protein	-1,570845852	0,025160691
Hp	Haptoglobin	-1,585217091	0,017603921
Itgb2	Integrin beta-2	-1,682102876	0,001452445
Ces1c	Carboxylesterase 1C	-1,689167842	0,004055996
Fga	Fibrinogen alpha chain	-1,701476478	0,012939713
Ifit1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	-1,702695606	0,000451744

F13a1	Coagulation factor XIII A chain	-1,70660535	0,001786761
C1qb	Complement C1q subcomponent subunit B	-1,757428278	0,000563932
Lgals3	Galectin-3	-1,758683652	0,000563932
C4b	Complement C4-B	-1,778715534	0,006293992
Cbln1	Cerebellin-1	-1,78358784	0,000451744
Serpina1d	Alpha-1-antitrypsin 1-4	-1,839427315	0,016831697
Samhd1	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1	-1,868542925	0,000451744
Ces1a	Carboxylic ester hydrolase	-1,86893427	0,01011021
Ces1b	Carboxylic ester hydrolase	-1,86893427	0,01011021
Ces1d	Carboxylesterase 1D	-1,86893427	0,01011021
Ces1g	Liver carboxylesterase 1	-1,86893427	0,01011021
Alb	Albumin	-1,880812434	0,035715264
S100a8	Protein S100-A8	-1,882344621	0,033747769
Hmgb2	High mobility group protein B2	-1,893170982	0,019187246
Orm1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	-1,90171083	0,008100784
Ifit3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	-1,908654208	0,043468177
Ifit3b	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3B	-1,908654208	0,043468177
Itih2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	-1,932520551	0,004040281
Fermt3	Fermitin family homolog 3	-1,950483664	0,000563932
B2m	Beta-2-microglobulin	-1,962024304	0,005223593
Gc	Vitamin D-binding protein	-1,975322798	0,009805687
Trf	Serotransferrin	-1,988184523	0,005011332
Itgb5	Integrin beta-5	-1,991894032	0,000451744
Itgb7	Integrin beta-7	-1,991894032	0,000451744
Hpx	Hemopexin	-2,008375257	0,015118282
Apoa1	Apolipoprotein A-I	-2,012635529	0,011872889
Fgg	Fibrinogen gamma chain	-2,021032596	0,005341632
H2-K1	H-2 class I histocompatibility antigen, K-B alpha chain	-2,022167799	0,004659666
Inhca	Inhibitor of carbonic anhydrase	-2,028082387	0,000451744
Psmb10	Proteasome subunit beta type-10	-2,034885136	0,009205461
Fgb	Fibrinogen beta chain	-2,036117858	0,000641341
Gbp7	Guanylate-binding protein 7	-2,049276663	0,000120958
Rac2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2	-2,119587469	0,007158285
Serpina1b	Alpha-1-antitrypsin 1-2	-2,133913583	0,020052065
Uba7	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 7	-2,159098045	0,006581122
Pzp	Pregnancy zone protein (Alpha-2-macroglobulin)	-2,234031723	0,000563932
C3	Complement C3	-2,242897407	0,00115738
Ncf2	Neutrophil cytosol factor 2	-2,253307038	0,006372864
Alox5ap	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	-2,25336644	0,001126599
Irgm1	Immunity-related GTPase family M protein 1	-2,312189425	9,63319E-05

Ifi47	IRG-type G domain-containing protein	-2,352460969	0,029114665
Iigp1c	Interferon inducible GTPase 1C	-2,367993307	0,032987573
Arhgdib	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	-2,381625925	0,003537243
Gbp10	Guanylate-binding protein 10	-2,431501653	0,002177315
Gbp6	Guanylate-binding protein 6	-2,431501653	0,002177315
Igtp	Immunity-related GTPase family M protein 3	-2,458285642	0,004040281
H2-L	H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain	-2,46785885	0,007158285
Kng1	Kininogen-1	-2,48830361	0,000972883
H2-Q10	H-2 class I histocompatibility antigen, Q10 alpha chain	-2,505497141	0,01863346
H2-Q4	Histocompatibility 2, Q region locus 4	-2,505497141	0,01863346
H2-Q6	Class Ib MHC antigen Qa-2	-2,505497141	0,01863346
H2-Q8	H-2 class I histocompatibility antigen, Q8 alpha chain	-2,505497141	0,01863346
H2-Q7	H-2 class I histocompatibility antigen, Q7 alpha chain	-2,505497141	0,01863346
Serpina3m	Serine protease inhibitor A3M	-2,51717146	0,023893617
Kng2	Kininogen 2	-2,53750349	0,000641341
Serpina3k	Serine protease inhibitor A3K	-2,567994271	0,015506441
Lrg1	Leucine-rich HEV glycoprotein	-2,581689267	0,000315205
Gbp2	Guanylate-binding protein 2	-2,73940219	0,01011021
Tgtp1	T-cell-specific guanine nucleotide triphosphate-binding protein 1	-2,743080716	0,000972883
Arg1	Arginase-1	-2,842717618	0,040673247
Tap1	Antigen peptide transporter 1	-2,894248889	0,00954352
Tapbp	Tapasin	-2,975973514	0,000704831
Serpina3g	Serine protease inhibitor A3G	-3,077902036	0,009418847
Serpina3n	Serine protease inhibitor A3N	-3,086056394	0,00115738
Serpina3i	Serine (or cysteine) peptidase inhibitor	-3,094882123	0,010218467

9.2 Certificado de comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação de drogas com ação nos sistemas glutamatérgico e canabinoide sobre as alterações comportamentais e bioquímicas observadas em um modelo murino experimental de encefalomielite autoimune (EAE).", protocolo do CEUA: 170/2020 sob a responsabilidade de Fabiola Mara Ribeiro que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 29/09/2020.

Vigência da Autorização	28/09/2020 a 27/09/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/BI6
Nº de animais	13

Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	13
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	78
Idade	8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57/Bl6
Nº de animais	78
Idade	8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	Biotério Central

Considerações posteriores:

10/01/2024	Pedido de Adendo Aprovado em 10/01/2024. Este pedido de adendo foi aprovado condicionado a resposta à diligência na reunião de 06/11/2023. Adendo aprovado para a inclusão de 6 grupos experimentais (n = 13) de camundongos C57BL/6 fêmeas.
29/09/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 28/09/2020. Validade: 28/09/2020 à 27/09/2025.
28/09/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 28/09/2020. Validade: 28/09/2020 à 27/09/2025.

Belo Horizonte, 15/02/2024.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

9.3 Artigo científico publicado

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net

1351

Current Neuropharmacology, 2025, 23, 1351-1366

REVIEW ARTICLE



The Dual Role of Microglia in Multiple Sclerosis and its Implications for Diagnostics and Repair

Melissa T. Goulart^{1,#}, Davi T.U. Queiroz^{2,#} and Fabíola M. Ribeiro^{1,*}

¹Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ²Department of Neurology, Felício Rocho Hospital, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE HISTORY

Received: August 05, 2024
Revised: October 07, 2024
Accepted: October 23, 2024

DOI:
10.2174/011570159X352356241126044933



Abstract: Microglia play a crucial role in the development, immune surveillance, and repair of the central nervous system. These cells play a multifaceted role in multiple sclerosis (MS), with evidence suggesting that microglia can promote both active inflammation and remyelination. For instance, it has been shown that microglia can support the development of oligodendrocytes and phagocytose myelin debris, thus aiding in proper remyelination. However, microglia overactivation in MS lesions exacerbates neuroinflammation by releasing inflammatory cytokines and facilitating the activation of astrocytes and immune cells, promoting demyelination and, ultimately, driving MS pathology. In fact, it has been shown that there is a correlation between activated microglia patterns and the chronicity of MS. Thus, although it is difficult to be certain whether these cells are friends or foes, there is no doubt that microglia will be a relevant target for MS diagnosis and treatment in the future, when further research will help to clarify the role of these cells in MS. MRI and PET scan allow evaluation of microglia/macrophages biomarkers, facilitating the clinical assessment of a patient's disease stage. Moreover, new microglia-specific markers are being discovered, which will increase diagnostic precision, helping to identify active and chronic MS lesions. Because microglia are involved in all MS phases, these cells are also an important drug target. In this review, we focus on the current understanding of the role of microglia in MS progression as well as on the evidence supporting both inflammatory and reparative functions of these cells. We will also review how microglia may yield new biomarkers for MS diagnosis and serve as a potential target for therapy.

Keywords: Multiple sclerosis, microglia, oligodendrocytes, demyelination, neuroinflammation, disease-modifying drugs.

1. INTRODUCTION

1.1. Microglia Origin and Functions in the Healthy and Diseased Brain

Microglia are mesodermal cells derived from the yolk sac, differing from other glial cells, as oligodendrocytes and astrocytes, which originate from the neuroectoderm [1]. Initially thought to derive from macrophages and tissue monocytes, it is now established that microglia originate from mesodermal progenitor cells that colonize the central nervous system (CNS) early during embryogenesis. These cells enter the CNS through the leptomeninges and lateral ventricles, spreading throughout the cerebral cortex, and being maintained over time by endogenous cells and circulating monocytes [2, 3]. Just as macrophages, which are primarily regulated by colony-stimulating factor 1 (CSF-1), microglial

development is also highly dependent on the colony-stimulating factor 1 receptor (CSF-1R) and its ligand, CSF-1. In homozygous mice with a null mutation in the *Csf1r* gene, microglia are depleted by more than 99% during the embryonic stage, and, after birth, microglial disruption persists in most brain regions, leading to structural modifications in the brain [4]. Moreover, transforming growth factor (TGF)- β 1 signaling is essential for microglia maturation and homeostasis, as well as for preventing microglial excessive activity [5]. Human microglia are very similar to mouse microglia, although certain genes are expressed in greater quantities in the human brain, including genes encoding complement system molecules, such as C3 and C2, as well as transcription-regulating genes [6]. Both human and mouse microglia respond to inflammatory contexts or injuries, indicating a conserved degree of cellular mechanisms and functions [7]. Therefore, studies using animal models can provide important insights.

To understand how microglia function in disease contexts, it is necessary to first comprehend their roles in a healthy environment. In a healthy CNS, microglia represent

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; E-mail: fmribeiro@icb.ufmg.br

[#]These authors contributed equally to this work and share first authorship.

about 10% of resident cells, although this percentage can vary by region, ranging from 5% to 12% [8]. They are considered self-renewing cells and participate in tissue remodeling of the brain and spinal cord throughout the maturation of these tissues. In the healthy CNS, they act as the main immune cells, functioning similarly to peripheral macrophages [9]. Under homeostatic conditions, they surveil the CNS, investigating potential damage and acting to prevent exacerbated responses. Microglia produce neurotrophic factors, such as insulin-like growth factor-1 (IGF-1), which promotes the maturation of oligodendrocyte precursor cells and trigger myelination [10], and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays a crucial role in neuronal function and also facilitates myelination [11-13]. In line with the idea that there are various subpopulations of microglia exerting specific roles, it has been proposed that CD11c⁺ microglia are responsible for producing IGF-1, facilitating myelination and neurogenesis in the developing mouse brain [12]. Moreover, during fetal development, microglia have been shown to be important for guiding neuronal migration, pruning synaptic terminals, and promoting myelin formation [14].

Microglia can orchestrate immune responses to infection and tissue damage, balancing tissue reaction and recovery [15]. Their actions can be triggered by various molecules, such as cytokines, chemokines, hormones, neurotransmitters, and adhesion molecules, and they can sense and process these signals through either microglial receptors or indirectly, through other cells [16]. Microglial defense activity can be essential in neurodegenerative diseases by clearing harmful and aggregating proteins, such as α -synuclein, mutant huntingtin, β -amyloid, prions, and oxidized or mutant superoxide dismutase [15]. This response can be initiated through Toll-like receptors (TLRs), leading to neuroinflammatory responses and cytokine release, ultimately aiding in clearing these proteins [17].

Upon detecting environmental changes, microglia can morphologically modify their processes. These modifications are highly dynamic, allowing their branches to sense areas around the cell body and polarize toward potential injuries [18]. Analysis of microglia morphological alterations can be helpful to understand biological processes involving these cells in various contexts, including neurodegenerative diseases [19]. Microglia can be subdivided based on morphology, cell surface receptors, molecule secretion, and functional properties [20]. In neurodegenerative diseases, such as AD, Parkinson's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), and multiple sclerosis (MS), microglia can assume various phenotypes [21]. Until recently, microglia were dichotomously classified as M1 and M2, with M1 representing classically activated neurotoxic cells and M2 representing alternatively activated neuroprotective cells [22]. This classification was also applied to other CNS cells, including astrocytes, which were subdivided into A1 and A2 [23]. However, this dichotomy is overly simplistic and inaccurate, as the cellular profiles are much more diverse, as revealed by new techniques, including RNA sequencing, which showed the temporal and spatial diversity of microglia cells [1, 24, 25]. Additionally, microglial gene expression varies across CNS tissues, highlighting the complexity of microglia activation. For instance, gray matter microglia exhibit increased expression of type 1 interferon (IFN)-related genes and comple-

ment genes, whereas white matter microglia show higher expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) inhibitory genes [26].

Upon detecting damage, microglia undergo transformations in gene expression, metabolism, motility, morphology, and proliferation. Morphological changes in processes begin within minutes of detecting CNS damage, with processes retracting over days and microglia assuming amoeboid characteristics, typical of macrophages [27]. However, in response to stress or aging, they can become hyperamified [28, 29]. Morphological changes alone do not characterize microglial activation, as a rapid response to CNS damage is mainly due to the high expression of damage-associated molecular pattern (DAMP) and pathogen-associated molecular pattern (PAMP) receptors on their surface. Consequently, microglia are essential for initiating inflammatory responses in infectious, neuroinflammatory, and neurodegenerative contexts [1, 24]. Microglial activation can lead to a series of consequences, both positive and negative. Microglia's detrimental role encompasses the release of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , reactive oxygen species, nitric oxide, and proteases. On the other hand, microglia's beneficial functions include the release of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10, and growth factors, including TGF- β , as well as the promotion of tissue repair, reconstruction of extracellular matrix, and phagocytosis of apoptotic cells [22]. The paradoxical role of microglia activation is well exemplified in Alzheimer's disease (AD), where disease-associated microglia (DAM) were identified near A β plaques, being responsible for clearing β -amyloid [30], although activated microglia was also shown to increase neuroinflammation and phosphorylate Tau protein [31]. Although the effects can range between two opposite poles, good or bad, it is worth noting that the understanding of what can be beneficial or harmful is still evolving. This can be exemplified in situations where a cytokine typically characterized as either pro-inflammatory or anti-inflammatory may act in the opposite way to its conventional role. For example, the cytokine IL-12, traditionally characterized as a pro-inflammatory cytokine, in an inflammatory and autoimmune context, such as the EAE model, can act to limit neuroinflammation [32]. As in several neurodegenerative diseases, microglia participate in many processes in the context of MS.

2. MULTIPLE SCLEROSIS

MS is an autoimmune, chronic, demyelinating neurological disease, most commonly occurring in young adults. MS prevalence is higher in women, with a ratio of 3:1. Incidence peaks at 29 years of age for women and 31 years for men, with a subsequent decrease in incidence above 40 years of age for both sexes [33]. The etiology of MS is multifactorial, involving genetic factors related to the human leukocyte antigen (HLA) gene as both risk and protective factors, as well as environmental factors, such as lifestyle habits, including increased body mass index, smoking, and infections, such as Epstein-Barr virus infection [34]. Although the pathophysiological process of MS still has some loose ends, it is well known that in the early stages of the disease, the rupture of the blood-brain barrier (BBB) facilitates the infiltration and accumulation of CD8⁺ T lymphocytes and monocyte-derived

macrophages, primarily around post-capillary venules in the periventricular white matter and in the cortex, which are key processes in the development of multiple sclerosis lesions [35]. T cell activation plays a crucial role in the immunopathogenesis of MS. Helper T cells (Th cells), particularly Th1 and Th17 cells, infiltrate the CNS and interact with microglia. Th1 cells, producing interferon-gamma (IFN- γ), and Th17 cells, secreting interleukin-17 (IL-17), are particularly important in mediating the inflammatory response and perpetuating tissue damage [35]. More recently, a subset of T helper cells known as ThGM, which produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), has also been shown to play a critical role in microglial activation and the amplification of inflammation within the CNS [36]. Meanwhile, B lymphocytes accumulate in clusters of ectopic lymphoid tissues in the meningeal region, mainly subpial, and in the perivascular space of blood vessels. They contribute to disease progression through multiple mechanisms, including antibody production, antigen presentation, and the secretion of pro-inflammatory cytokines [37]. These B cell-rich areas have been associated with cortical demyelination and gray matter atrophy, contributing to the disease's clinical progression [35, 38, 39]. B cells act as potent antigen-presenting cells, providing costimulatory signals to T cells and promoting their activation. This interaction between B cells and T cells further intensifies the inflammatory cascade within the CNS. Additionally, B cells secrete cytokines such as interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which promote the activation of microglia. Peripheral cells join the resident cells of the CNS, astrocytes, and microglia, which are now activated and, together, they promote demyelination and lesions to oligodendrocytes and neurons. This process occurs through direct cell-cell contact or *via* mechanisms dependent on the secretion of inflammatory and neurotoxic mediators [40].

The disease course comprises different phenotypes. Following its 2013 revision, Lublin *et al.* described its subdivision into clinically isolated syndrome (CIS), with patients exhibiting typical clinical symptoms of MS with correlating magnetic resonance imaging findings, but without meeting the McDonald clinical criteria for MS. The relapsing-remitting form (RRMS), characterized by recurrent attacks that may or may not be followed by a full recovery, is the most typical, affecting approximately 85% of MS patients. Of these, 50% of patients experience symptom deterioration independent of relapses (progression independent of relapse activity - PIRA), categorizing them as having the secondary progressive form (SPMS). Moreover, 15% of all patients present with progressive worsening of neurological symptoms from onset, classified as primary progressive MS (PPMS). Even within progressive forms, attacks may persist or cease, leading to a subdivision into active or non-active forms (Figs. 1A and 1B) [41].

During relapses, patients exhibit characteristic neurological signs of central nervous system involvement, such as low visual acuity and dyschromatopsia (optic neuritis), sensory alterations, gait instability, and vertigo, among others. The spinal cord, brainstem, and optic nerve are most commonly affected [33, 42]. To be qualified as a relapse, symptoms must exhibit subacute onset, worsening over days until reaching a plateau. Additionally, infection or fever should be

ruled out as confounding factors for clinical worsening (pseudo relapses) [43]. PIRA marks the onset of clinical progression phases, either in PPMS or SPMS, and manifests as persistent disability, worsening over 6 to 12 months without concurrent relapses during the evaluation period and within the three months prior to the onset of worsening [44]. Of note, patients with RRMS whose disease onset takes place after 40 years of age, are male, and experience spinal attacks tend to show signs of progression earlier than others [33, 45]. On average, such symptoms emerge approximately 15 years after MS onset. Disability can be assessed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS), although limitations exist due to inter and intra-examiner reproducibility variation. Other assessments aiding disability determination include the nine-hole peg test (9HPT) and the time to 25-foot walk test (time to 25FWT), evaluating upper limb motor coordination and gait capacity, respectively. Attacks with incomplete recovery (relapses and worsening - RAW) contribute to performance deterioration in these tests over 10 years, serving as contributing factors for long-term disability accumulation. Additionally, cognitive function can be briefly assessed using the symbol-digit test (SDT), an important tool to evaluate patients with progressive forms of MS. PIRA also plays a crucial role in disability accumulation, especially in patients not receiving disease-modifying treatment [46].

3. DIFFERENT PHASES OF MULTIPLE SCLEROSIS

The phenotypic presentation of MS, characterized by relapses or PIRA, closely correlates with the pathophysiological process of neuronal damage. Active/inflammatory lesions, predominant in initial disease phases, feature the involvement of T lymphocytes, with microglia playing a key role in myelin protein phagocytosis, antigen presentation to T lymphocytes, and release of proinflammatory cytokines [25]. Histopathological analysis of active MS lesions reveals a diffuse infiltrate of microglia, macrophages, T lymphocytes, and plasma cells [47]. These four components are also present during the demyelination phase, as well as post-demyelination, differing on the type of products found within microglia cytoplasm. Engulfment by microglia of minor myelin proteins, such as myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP), and myelin-associated glycoprotein (MAG), along with major myelin proteins, including myelin basic protein (MBP) and proteolipid protein (PLP), characterize recent demyelinating lesions. Later demyelinating lesions entail the presence of major myelin proteins in microglia cytoplasm [48]. Active lesions can be classified into four patterns, according to Lucchinetti *et al.* classification. The four patterns of alterations in MS demonstrate distinct features. Patterns I and II share several similarities, with active demyelination characterized by T-lymphocyte and macrophage-dominated inflammation. The primary difference is the prominent deposition of immunoglobulins (mainly IgG) and complement C9neo antigen at sites of active myelin destruction in pattern II lesions, a feature absent from pattern I. Pattern III lesions differ as demyelination is not centered around veins and venules. Instead, these lesions frequently show a rim of preserved myelin around inflamed vessels within the demyelinated plaque. Pattern IV lesions also have inflammatory infiltrates dominated by T lymphocytes and macrophages, but

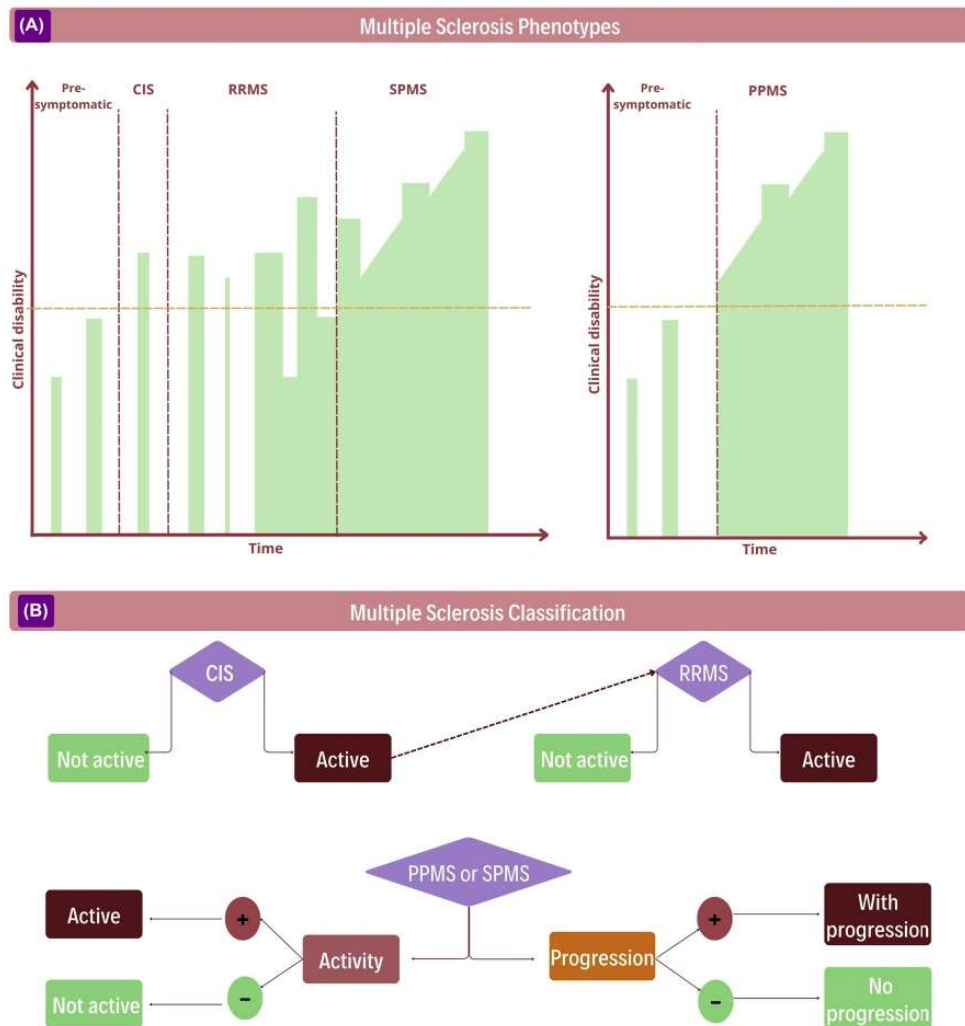


Fig. (1). (A) Graphs show the clinical progression of disability accumulation over time for different MS phenotypes. The left graph represents the RRMS phenotype, marked by relapses, which evolves into the SPMS form that may present relapses, but with a predominance of PIRA. It is important to note that there may be disease activity below a clinical threshold (dashed yellow line), which may correspond, for example, to changes in magnetic resonance imaging. The right graph represents the PPMS form, where PIRA predominates from the beginning, but relapses can also occur during disease progression. (B) Illustrative scheme of multiple sclerosis (MS) phenotypes according to Lublin *et al.* 2013. **Abbreviations:** CIS: clinically isolated syndrome; RRMS: relapsing-remitting MS; SPMS: secondary-progressive MS; PPMS: primary progressive MS; PIRA: progression independent of relapse activity. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

lack deposition of immunoglobulins and complement C9neo antigen. Demyelination in these lesions is associated with oligodendrocyte death in a small rim of periplaque white matter adjacent to the zone of active myelin destruction (Figs. 2A-C) [49]. During the progressive phase of MS, more pronounced in late disease stages, mixed lesions become common, characterized by chronic active lesions or "slowly expanding lesions" ("smoldering lesions"). These lesions feature a hypocellular center and significant activation of microglia and macrophages at their periphery (Fig. 2B) [25, 50]. Iron deposition within the cytoplasm of activated

microglia and macrophages occurs during this process, an uncommon finding in inactive lesions and absent during the remyelination process of active lesions, serving as a hallmark of chronic active lesion pathophysiology. Clinically, these findings correlate with a poorer prognosis and disability accumulation. Luchetti *et al.*'s study histologically evaluated brains from the Netherlands Brain Bank (NBB), demonstrating a positive correlation between acute lesions and microglial activation at the lesion site. Progressive phenotypes exhibit a higher proportion of chronic active lesions, directly associated with increased lesion load and reduced remyelination.

ated lesion proportion. Moreover, the higher the proportion of chronic active lesions, the higher the patient's disability score (EDSS) at the time of death [51].

Given the importance of preventing disability accumulation and altering the natural history of MS, the early use of highly effective disease-modifying drugs has been a recurring topic of discussion. Consequently, various therapeutic targets have been studied. Microglia play a pivotal role in MS activity, both in early/inflammatory phases and during progression [52]. However, a drug mechanism with direct action on these cells resulting in a significant effect remains undiscovered, with current interventions exerting only indirect effects. The following topics in this review aim to comprehensively describe the multifaceted roles of microglia in MS, including their involvement in myelin damage and the processes of remyelination. Moreover, current methodologies to evaluate microglial activity in clinical practice and to identify potential therapeutic targets to modulate their function, aiming at improving treatment outcomes, will also be explored.

4. INTERACTION BETWEEN MICROGLIA AND OTHER CNS CELLS IN THE CONTEXT OF MS

Microglia are involved in various processes in MS, from disease onset to more advanced and chronic stages. The major debate is whether microglia plays a beneficial role or is merely a villain. It appears that the roles of microglia are ambiguous and highly dependent on the disease stage. As the primary immune cell of the CNS, microglia can communicate with various cell types, leading to a series of positive or negative actions, depending on the context [53, 54]. Astrocytes, microglia, and oligodendrocytes create a highly controlled and suitable environment in the CNS for neuronal and cellular survival in general [55]. They not only maintain neuronal homeostasis but also interact directly with other cells to promote a balanced response.

Microglial communication with almost all cell types can promote either the maintenance of homeostasis or the development of pathogenic cascades, which are common in neurodegenerative and inflammatory diseases such as MS [18]. Besides interacting with other glial cells, such as oligodendrocytes and astrocytes, a highly studied and extremely important interaction is with neurons. In homeostasis, the interaction between microglia and neurons is essential for the proper functioning of the CNS, as it can control neuronal survival, participate in neurogenesis, as well as form or prune synapses [56, 57]. Microglia can act on neurons by activating many pathways and secreting various molecules and signals, which can lead to several cascades of reactions [19]. Microglia-neuron communication is bidirectional, as the ability to control function and the activation of cell signaling pathways is not limited to microglia, with neurons also being able to trigger various microglial responses. Ronzano *et al.* (2021) showed that microglial interaction with the nodes of Ranvier is mediated by neurons, which leads to a pro-remyelination effect after myelin injury [58]. Additionally, the interaction of CD200 and its neuronal receptor can modulate microglial activation and regulate synaptic plasticity [59, 60]. Furthermore, the activation of NMDA receptors expressed by neurons can lead to microglial

process branching [61]. In the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model, a classic experimental model of MS, microglial activation can significantly impair neuronal function by either releasing pro-inflammatory mediators that alter glutamatergic signaling or producing other factors such as reactive oxygen species, which can lead to synaptic and even cognitive alterations [22, 62, 63]. Conversely, some already approved and used disease-modifying treatments (DMTs) for MS can improve these processes by either reducing synaptic dysfunction in EAE or decreasing the release of inflammatory mediators by microglia [64-67].

Microglial communication with astrocytes begins early during neurodevelopment and CNS cell colonization, playing an important role in maintaining homeostasis [23]. In addition, this bilateral communication is essential for the neuroinflammatory processes that take place in MS [68]. This interaction occurs through the secretion of various signaling molecules, cytokines, chemokines, and extracellular vesicles. The consequences in MS can be beneficial or harmful, depending on the context. Microglia can secrete NF- κ B, complement component 1q (C1q), IL-1 α , and TNF- α , which can lead to a wide range of detrimental responses in the context of MS, including the induction of a pro-inflammatory phenotype in astrocytes [68]. These responses can range from activating inflammatory cascades to expressing neurotoxic factors and decreasing phagocytic activity. A positive consequence in the context of MS is the release of TGF- α by microglia that can act on the astrocytic ErbB1 receptor, which was shown to limit disease progression in the EAE mouse model by releasing neuroprotective factors. Additionally, a type of microglia with an anti-inflammatory genetic signature was shown to secrete IL-10, which through its astrocytic receptor induces TGF- β secretion, inhibiting microglia activation [68, 69]. Employing the widely used murine model of MS, the cuprizone model, where oligodendrocyte death and demyelination is induced by the copper chelator cuprizone, it was observed that the recruitment of microglia by astrocytes to demyelinating lesions can be beneficial and restorative due to the phagocytic function of microglia, which removes myelin debris and enables the proliferation of oligodendrocyte precursors [70].

Oligodendrocytes respond very differently depending on the microglial population stimulating them. Microglia play a crucial role in the development of mature oligodendrocytes by secreting essential factors that foster proper homeostasis of oligodendrocyte precursors and mature cells [71]. Both activated and stationary microglia secrete factors as IGF-2 and galectin-2/3, which are responsible for oligodendrocyte precursors proliferation [72]. Thus, depending on the amount and type of factors secreted by microglia, the result is the acceleration or slowdown of oligodendrocyte precursor development. Another essential role in the context of MS is myelination, which can be influenced by the imbalance of microglial pruning of oligodendrocyte precursors, mediated by fractalkine. Additionally, microglia promote remyelination by phagocytosing myelin debris, leaving the environment conducive to the process [73]. However, excessive microglial activation can further damage OLs. For instance, activated microglia present in MS proactive lesions release TNF- α , a cytokine shown to kill oligodendrocytes in culture [74].

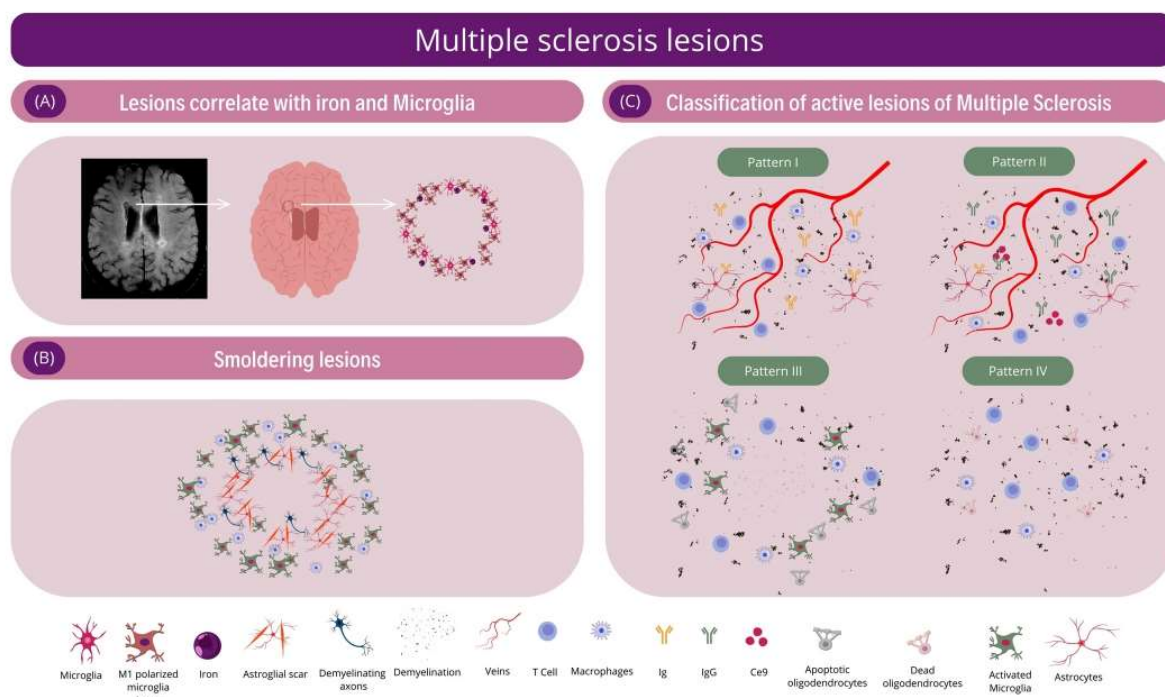


Fig. (2). Panel of microglia-related lesions in multiple sclerosis. **(A)** MRI of a brain with a chronically active lesion and a border rich in activated microglia showing an axial brain slice in a magnetic susceptibility sequence, with the white arrow pointing to a ring-like hypointense region in the periventricular area on the right. This hypointense finding in susceptibility sequences corresponds to changes related to iron deposits in areas of multiple sclerosis (MS) lesions. There is a correlation between this finding and the histopathological analysis of chronically active lesions, which have a hypocellular inner region with a border rich in activated microglia. The presence of iron-laden microglia indicates chronic activation and ongoing neuroinflammation. In the right panel, representation of a lesion showing a ring of microglia with the presence of iron. (MRI provided, courtesy of Dr. Thyago Oliveira de Queiroz, neuroradiologist at Felício Rocho Hospital) **(B)** Smoldering lesions - The center of the lesion is inactive, with no remyelination or myelin proteins, and exhibits extensive axonal loss. There is the presence of astroglial scar tissue surrounding the demyelinated axons. At the edge of the lesion, activated microglia and macrophages appear, which may contain myelin degradation products. Additionally, there can be extensive and diffuse microglial activation in areas surrounding normal-appearing white matter. **(C)** Patterns of demyelinating lesions based on Lucchinetti *et al.*, 2000. Pattern I: lesions marked by active demyelination associated with inflammation predominantly by T lymphocytes and macrophages. Additionally, there is diffuse immunoglobulin (Ig) reactivity in astrocytes. The demyelination plaques are centered on small veins and venules, with extensive loss of myelin proteins that form the myelin sheath. Pattern II: contains all the characteristics of Pattern I lesions but also has prominent IgG deposition and C9neo complement antigen. This marked Ig reactivity is associated with myelin degeneration. Pattern III: lesions with inflammatory infiltrates of T lymphocytes, macrophages, and activated microglia, characterized by significant loss of oligodendrocytes at the active plaque edge. The lesion center is inactive, devoid of oligodendrocytes, and lacks remyelination. Oligodendrocyte death is characteristic of apoptosis. Pattern IV: inflammatory infiltrate dominated by T lymphocytes and macrophages, where demyelination is associated with non-apoptotic oligodendrocyte death. There is almost complete loss of oligodendrocytes in both active and inactive areas of these lesions. Patterns I and II resemble autoimmune pathology, whereas Patterns III and IV are indicative of primary oligodendrocyte lesions, suggesting pathologies induced by non-autoimmune pathways. (A higher resolution/colour version of this figure is available in the electronic copy of the article).

5. MICROGLIAL ROLE IN MYELIN DAMAGE AND REMYELINATION IN ANIMAL MODELS OF MS

The myelin sheath is a lipid-rich membrane that surrounds neuronal axons. Its function is to speed up the electrical signal transmitted along the axons and maintain metabolic support for neurons [75, 76]. Oligodendrocytes are the cells responsible for a process called myelination, which occurs when these cells extend their processes to the axons and wrap around them discontinuously [77]. In neurodegenerative diseases such as MS and AD, the loss of the myelin sheath, known as demyelination, can occur [78]. Demyelination happens when there is a loss of myelin around neu-

ronal axons. In MS, demyelination occurs both due to an imbalance in the inflammatory response and the dysregulation of oligodendrocytes. Changes in the myelin sheath itself can precede demyelination, as it has been observed that in normal-appearing white matter areas of patients with chronic MS, there were already changes in the lipid profile of myelin sheath proteins [79]. In animal models and patients with MS, demyelination can occur after structural changes in the myelin or after the death of oligodendrocytes [80-83]. Interestingly, hypermyelination can also precede demyelination, as demonstrated in mice [84]. A natural regenerative process that occurs after demyelination in the mammalian CNS is

remyelination. With demyelination, the axon remains intact, but remyelination is necessary; otherwise, axonal degeneration will occur [85]. In demyelinating diseases such as MS, remyelination can fail and lead to the accumulation of permanent damage to the CNS [86]. The processes involving this remyelination failure may occur due to a deficiency in the activation, recruitment, and differentiation of OPCs and neural stem cells [87-89]. Additionally, microglia can act by increasing inflammatory and neurodegenerative processes that hinder remyelination [88].

Many mechanisms can be employed by microglia to cause damage to the myelin sheath, from direct actions on oligodendrocytes to indirect actions influencing other cells that contribute to demyelination. Although myelin phagocytosis initially occurs through the action of T cells that specifically target myelin, these cells are activated by antigen-presenting cells such as microglia and dendritic cells, initiating the inflammatory cascade observed in both the EAE mouse model and MS [73]. Microglia can also cause damage to myelin by releasing nitric oxide (NO) and glutamate [73]. Moreover, using the EAE model, it has been demonstrated that microglia can directly facilitate the breakdown of the BBB by activating an inflammatory process and promoting autoimmune inflammation [90, 91]. Thus, it is evident that the actions of microglia play a fundamental role in the initiation and establishment of MS pathology.

Direct and indirect contributions of microglia to demyelination have been demonstrated in animal models of MS [7]. The inflammatory response induced by microglia is a powerful tool that affects all cells in the CNS, including oligodendrocytes. Microglia can act both to harm and to favor processes involving the myelin sheath in MS and other neurodegenerative diseases such as AD. In the cuprizone model, it was observed that microglia depletion reduces the extent of demyelinating lesions and decreases oligodendrocyte loss [92]. Furthermore, treating the cuprizone mouse model with the CSF-1 kinase activity inhibitor (BLZ94) results in decreased number of microglia, improved remyelination, and diminished demyelination, along with improved motor function [93, 94]. On the other hand, treating EAE mice with another CSF-1 receptor antagonist, PLX3397, which also leads to microglia depletion, leads to increased T cell proliferation in the CNS and worsened clinical score when the drug is administered during the chronic phase, indicating that microglia may be important for suppressing the secondary progression of autoimmune encephalomyelitis [95]. However, in the cuprizone model, treatment with PLX2297 improves the extent of demyelination, oligodendrocyte loss, and reactive astrogliosis, also improving motor recovery [86, 92]. This autoimmune inflammatory process might be aided by a non-canonical NF- κ B pathway. By selectively deleting the non-canonical NF- κ B-inducing kinase (NIK) in microglia, demyelination is reduced and EAE progression is halted [91]. The same does not occur in the initial phase of the model, where an inflammatory response mainly mediated by T cells is initiated. Moreover, demyelination induced by microglia can occur indirectly, through signaling by a colony-stimulating factor receptor (CSF) [91]. In the cuprizone model, selective depletion of this receptor in microglia significantly reduces demyelination and oligodendrocyte loss [92]. Thus, considering the results obtained in animal models

of MS, it is not possible to be certain whether microglia play a harmful or beneficial role in myelin handling.

The phagocytic capacity of microglia is essential in the context of MS lesions, as repairing the demyelinated tissue filled with dead cells and debris requires an initial “cleaning”, allowing subsequent repair of the damage. Microglial phagocytosis can remove large myelin debris and even entire dead cells [96]. After phagocytosis, microglia must effectively process the absorbed content; otherwise, the process could aggravate the neuroinflammatory lesion [97]. In MS lesions, iron deposition can occur, leading to a series of detrimental events for various cells, including microglia. Iron is normally found in oligodendrocytes, and is important for myelin formation, as iron is a cofactor for the biosynthesis of cholesterol and lipids, essential components of myelin [98, 99]. However, in pathological situations such as MS, the destruction of oligodendrocytes and myelin results in extracellular iron deposition, leading to oxidative stress and increased polarization of microglia and macrophages towards a pro-inflammatory profile. In an attempt to avoid more damage, microglia and macrophages phagocytose the deposited iron [98]. However, iron-induced toxicity can lead to the degeneration of these myeloid cells, promoting additional waves of iron deposition and tissue damage [99]. In addition, it has been demonstrated that in chronic demyelinating lesions in the white matter, there is iron in M1 microglia/macrophages and non-phagocytic cells [100]. This is an important feature of MS pathology, as iron accumulation is detected by iron-sensitive magnetic resonance imaging (MRI) even during the early stages of MS, and this accumulation correlates positively with disease progression [101-103].

Despite being implicated in myelin sheath damage and demyelinating processes, microglia can also act to promote remyelination. The remyelination process restores the conduction of electrical impulses and redirects metabolic and trophic support to the axons. This occurs when OPCs migrate to the lesion area, proliferate, and develop into new mature myelinating oligodendrocytes. This entire process is facilitated by the actions of microglia, which release regenerative factors and phagocytose myelin debris, creating an ideal environment for OPCs to enter the remyelination process [104]. In addition to the classic remyelination process, involving newly differentiated OLs, mature OLs can also extend their processes again and remyelinate a demyelinated axon [105]. This type of remyelination can occur after OLs lose their processes following injury, although it happens to a lesser extent, resulting in inefficient and poorly directed remyelination. Moreover, the exact molecular mechanisms underlying these processes are still not fully elucidated [96].

By secreting neuroprotective and neurotrophic factors, including platelet-derived growth factors (PDGFs), vascular endothelial growth factors (VEGFs), transforming growth factors (TGFs), and insulin-like growth factor 1 (IGF1), microglia can further facilitate myelin repair by stimulating the proliferation, differentiation, and recruitment of OPCs [7]. By releasing cholesterol, microglia can help OPCs in myelinogenesis and proliferation processes [106, 107]. Another form of myelin repair is the modulation of the extracellular matrix (ECM), achieved through the secretion of various matrix metalloproteinases (MMPs) and transglutaminase 2

(TG2), which can lead to the recruitment and differentiation of OPCs [104]. Interestingly, it has been proposed that the mechanism by which microglia can assist in remyelination may be related to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), a cytoplasmic receptor and transcription factor that operates in various physiological and pathological pathways, regulating processes such as inflammation resolution, differentiation, and immune cell function, among others [108, 109]. It has been demonstrated that repairing acute demyelinating lesions triggered by cuprizone can occur through sterol release by microglia [9]. Furthermore, AhR deletion in microglia impairs remyelination and causes the accumulation of myelin debris by impairing microglial phagocytic function [110]. Another important receptor is the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) expressed by microglia, whose activation leads to remyelination and increased removal of myelin debris in the CPZ model [111]. In the lysophosphatidylcholine-induced demyelination model, it was demonstrated that microglia depletion reduces the recruitment and proliferation of OPCs, resulting in impaired remyelination [112].

Microglial actions on the myelin sheath are not exclusively beneficial or harmful, as they can be ambiguous. Using a mutant mouse model with defective PLP protein, Groh *et al.* (2023) demonstrated that microglial function in demyelination is more complex than previously thought. Axonal degeneration and loss of function occurring in demyelinating diseases such as MS are primarily attributed to myelin loss. However, it has been shown that persistent coating with disturbed myelin poses a risk of axonal degeneration, neuronal loss, and behavioral decline [113]. Moreover, it appears that axonal damage caused by CD8⁺ T cells is less likely to result in progressive degeneration when activated microglia efficiently mediate demyelination [113]. Thus, the role of microglia in remyelination/demyelination is controversial and more studies are needed to elucidate the mechanisms underlying these processes, especially because myelin alterations in MS are an important target for the development of effective therapies to treat patients.

6. EVALUATION OF MICROGLIA IN CLINICAL PRACTICE

Given the importance of microglial activation in the pathophysiology of MS and the correlation between activated microglia patterns and the phases of MS, evaluating microglia is pointed as a potential strategy to facilitate the clinical assessment of a patient's disease stage.

Susceptibility-weighted MRI sequences enable the visualization of iron deposition sites, distinguishing iron concentrations and differentiating iron from calcium [110]. Myelin loss and consequent loss of lipid macromolecules increase the region of magnetic susceptibility values, allowing iron rim lesion detection in MS using MRI [101]. These lesions correlate with iron and CD68⁺ microglia/macrophages distribution in histopathological analysis, serving as a biomarker for chronic lesion activity in MS (Fig. 2A) [101, 114]. Additionally, the C1q, a crucial part of the classical complement pathway involved in the immune response, is expressed by microglia at the edges of chronic active lesions. This expression has been identified as a significant factor in driving in-

flammation. The presence of C1q in these regions further supports its potential as a biomarker for monitoring the progression of chronic lesions in MS [115].

An additional method for assessing microglial activation involves positron emission tomography (PET) with radio-tracer targeting the translocator protein (TSPO), a protein located on the mitochondrial membrane that is upregulated during microglial activation [116]. The tracer 11C-(R)-PK11195 exhibits high affinity to TSPO in MS active/inflammatory lesions, which reduces post-treatment with highly effective drugs [117, 118]. Of note, significant binding in normal-appearing white matter is more common in SPMS than in the RRMS [119].

Another biomarker studied in MS is neurofilament light (NfL), a protein found in neurons that is a component of neurofilaments, essential for the maintenance of axonal structure and function. Elevations in NfL levels are observed in various neurological diseases, including MS. Recent studies indicate that NfL levels may be useful for assessing disease activity and treatment response in patients with MS [120]. There appears to be an association between serum NfL levels (sNfL) and microglial activation measurable by PET in the brains of MS patients, such that the higher the distribution volume of 11C-(R)-PK11195, the higher the level of sNfL. This fact demonstrates the importance of active chronic lesions in promoting neuroaxonal damage [121].

7. DISEASE-MODIFYING THERAPIES AND MICROGLIA

Over the past two decades, more than a dozen drugs were approved for MS treatment, particularly for the relapsing forms [122]. In general, these drugs act by either depleting immune cells in the periphery or preventing their transmigration into the CNS. It has been shown that disease-modifying therapies (DMTs) can potentially affect microglia directly or indirectly. However, the extent and significance of these effects on microglia remain unclear and require further investigation [123]. Medications that do not cross the BBB, such as IFN- β and glatiramer acetate, act on microglia by causing a change in the pattern of peripheral T lymphocytes. Meanwhile, oral medications like fingolimod access the CNS and act directly on microglia. The advent of immunobiological therapies has revolutionized the management of MS, offering more targeted approaches to modulate the immune system and reduce disease activity. These medications work by specifically targeting components of the immune system, thereby decreasing the frequency and severity of relapses and slowing the progression of disability [124]. However, the level of monoclonal antibodies found in the CNS is low, so their direct action on microglia is questionable. Probably, similar to IFN- β and glatiramer acetate, medications such as natalizumab, ocrelizumab, ofatumumab, and alemtuzumab will show only indirect effects on microglia.

IFN- β is a subcutaneously or intramuscularly administered DMT approved for the treatment of RRMS, but without positive results for the treatment of progressive phases, as shown in the case of SPMS [125, 126]. However, IFN- β acts on peripheral T cells by promoting a shift towards the Th2 profile, in addition to promoting the production of B-cell

activation factor (BAFF). Thus, the lymphocytes reaching the CNS exhibit a profile with a lower predisposition to activate a neurotoxic type of microglia [127]. The same shift in T lymphocyte profile to Th2 occurs with the use of glatiramer acetate, an immunomodulatory medication composed of a polymer of four amino acids (glutamic acid, lysine, alanine, tyrosine). Additionally, glatiramer acetate may promote neuroprotection by inducing the secretion of neurotrophic factors from T cells, further contributing to its therapeutic effects in MS [123, 128]. Another medication that also allows for greater activation of the Th2 pattern with the production of IL-4 and IL-5 is the oral medication dimethyl fumarate. However, this drug is capable of crossing the BBB and within the CNS it induces an antioxidant response and an inhibitory effect on pro-inflammatory molecules [129, 130]. Therefore, all these drugs might affect microglia indirectly.

Teriflunomide is the active metabolite of leflunomide, which acts by altering pyrimidine synthesis [131]. This is a crucial point for the metabolism of cells with a high proliferation rate, including active T and B lymphocytes [132]. As mentioned, some oral medications can cross the BBB and possibly exert a direct action on microglia. However, there is no evidence that teriflunomide crosses the BBB [132]. Thus, this drug could act on microglia indirectly. Meanwhile, fingolimod, a sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor modulator, is highly lipophilic and can cross the BBB, reaching the cerebral white matter [133]. In a phase 3 clinical study for RRMS, it was observed that fingolimod reduced disease progression and brain atrophy [134]. However, it failed to demonstrate similar outcomes for patients with PPMS [135]. The main mechanism of action of fingolimod occurs peripherally by preventing the flow of lymphocytes out of the lymph node, dependent on the S1P gradient [136]. However, S1P receptors are present in CNS cells in different distribution patterns. Fingolimod binds to all S1P receptor subtypes, except subtype 4 (S1P4R). It is well known that microglia mainly express S1PR1, S1PR3, and S1PR5 receptors [137]. Evaluation in mice suggests that fingolimod binding to S1PR1 down-regulates the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1, IL-6, and TNF- α in activated microglia. Additionally, it up-regulates the production of BDNF, thus modulating microglial activation for the production of remyelination markers [138]. Siponimod, a medication approved for the treatment of RRMS and SPMS, is also an S1P modulator, but selective for S1PR1 and S1PR5 receptors [139]. The main mechanism of action of this drug is also related to lymphocyte flow through the lymph node through the S1P gradient. However, Gruchot *et al.*, using murine-derived microglia culture, demonstrated that siponimod prevents microglia from altering their cytoskeleton to activated forms, reduces the expression of induced Nitric Oxide Synthase (iNOS) protein, and modulates cytokine production by microglia, preventing TNF- α upregulation [140]. TNF- α increases glutamatergic excitotoxicity, enhances neuroinflammatory response, and can induce oligodendrocyte death [141]. In MS, TNF- α levels are directly correlated with increased disability and a higher risk of disease progression [142]. Thus, siponimod positive effects on MS may also rely on its direct actions on microglia.

Natalizumab was the first monoclonal antibody approved for the treatment of MS [143]. Its mechanism of action involves reducing the passage of lymphocytes across the BBB by binding to the α -4- β -1 integrin receptor, which interacts with cell surface adhesion molecules (CAM) and facilitates the initiation of the cell diapedesis process [144]. Although not found in the CNS, natalizumab leads to a reduction in the binding of the radiotracer 11C-(R)-PK11195 to TSPO in patients [118, 145]. Ocrelizumab, ofatumumab, and ublituximab are monoclonal antibodies approved for MS treatment that act on B lymphocyte CD20 receptors, resulting in the depletion of these cells [146-150]. Rituximab also has a similar mechanism of action, with efficacy already described in the literature for controlling MS activity, although it is not approved by the Food and Drug Administration (FDA) and European Medicines Agency (EMA) [151]. Throughout the pathophysiological evolution of MS, tertiary lymphoid tissue follicles containing B lymphocytes develop, leading to "compartmentalized inflammation" in the CNS [152]. These tertiary follicles are located in the subpial region, but also in some perivascular regions. Despite positive results demonstrating a reduction in disability progression following treatment with these medications, it is not certain that they can act on the lymphoid tissues and interrupt the inflammatory process [153]. Another monoclonal antibody approved by the FDA for MS treatment is alemtuzumab, which targets CD52 expressed on the cell surface of myeloid cells, B lymphocytes, and T lymphocytes [154]. During lymphocyte reconstitution in RRMS patients treated with alemtuzumab, it is observed an increase in the production of neuroprotective factors, such as BDNF [155]. In summary, while the primary mechanisms of immunobiological treatments involve modulating lymphocyte activity and reducing inflammation in MS, these therapies may also indirectly influence microglial activity by altering the overall inflammatory milieu within the CNS. This indirect modulation could potentially affect microglial activation states and their role in neuroinflammation, thereby contributing to the therapeutic effects observed in MS treatment.

Cladribine is a synthetic analog of deoxyadenosine, given to patients orally, that selectively depletes lymphocytes. Cladribine is capable of crossing the BBB and acting directly on resident microglia [156]. A study with primary cultured murine microglia demonstrated that only activated microglia are affected by cladribine actions. Additionally, treatment with this drug leads to an increase in the production of anti-inflammatory mediators, suggesting that microglia acquire a less active phenotype when treated with cladribine [157].

The Bruton tyrosine kinase (BTK) is an important intracellular signaling molecule involved in the maturation, proliferation, survival, and activation of B and myeloid cells [158]. Preclinical studies have shown that BTK inhibition can reduce microglial activation and, therefore, there was significant anticipation regarding the potential of this molecule for MS treatment [159]. However, the EVOLUTION study evaluating the efficacy of evobrutinib (a BTK inhibitor), as compared to teriflunomide, was discontinued due to not achieving the primary outcome of reducing the annualized relapse rate [160].

In summary, while the primary mechanisms of immunobiological treatments involve modulating lymphocyte activity and reducing inflammation in MS, these therapies may also produce positive effects on MS by indirectly influencing microglial activity by altering the overall inflammatory milieu within the CNS. Ongoing research on the impact of these medications on microglia is essential to fully understand their therapeutic potential, improve existing treatment strategies, and develop new approaches to control inflammation and neurodegeneration in MS.

CONCLUSION

Microglia have a central function in MS pathology, being active at all disease stages. These cells play multifaceted roles in MS, as their initial response is protective, most likely trying to limit insult to the CNS. However, over time, exacerbated activation of microglia may also lead to elevated expression of harmful molecules that drive neuroinflammation and contribute to MS neuropathology. On one hand, microglia can secrete factors that play a crucial role in the development of oligodendrocytes and reduce neuroinflammation by phagocytosing myelin debris, thus aiding in proper remyelination. On the other hand, in MS lesions, these cells release cytokines that can activate astrocytes and immune cells, triggering the expression of neurotoxic factors and exacerbating neuroinflammation. Although it is difficult to be certain whether these cells are friends or foes, there is no doubt that microglia will be a relevant target for MS diagnosis and treatment in the future. MRI and PET scans allow evaluation of microglia/macrophage biomarkers, facilitating the clinical assessment of a patient's disease stage. Moreover, new microglia-specific markers are being discovered, which will increase diagnostic precision, helping to identify active and chronic MS lesions. Because microglia are present in all MS phases, these cells are also an important drug target. However, it is important to mention that the development of effective therapies targeting microglia depends on a well-refined characterization of microglia activation patterns, as we now know that there are several populations of microglia, whose origination depends on their surroundings, activating molecules, and disease context.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

The authors confirm their contribution to the paper as follows: M.T.G, D.T.U.Q and F.M.R. were responsible for the manuscript writing, proofreading and editing. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

LIST OF ABBREVIATIONS

AD	=	Alzheimer's Disease
ALS	=	Amyotrophic Lateral Sclerosis
BBB	=	Blood-brain Barrier
BDNF	=	Brain-derived Neurotrophic Factor
BTK	=	Bruton Tyrosine Kinase
CNS	=	Central Nervous System
CIS	=	Clinically Isolated Syndrome

CSF-1	=	Colony-stimulating Factor 1
DMTs	=	Disease-modifying Therapies
DMTs	=	Disease-modifying Treatments
ECM	=	Extracellular Matrix
HLA	=	Human Leukocyte Antigen
iNOS	=	Induced Nitric Oxide Synthase
IGF1	=	Insulin-like Growth Factor 1
IL-17	=	Interleukin-17
MRI	=	Magnetic Resonance Imaging
MMPs	=	Matrix Metalloproteinases
MS	=	Multiple Sclerosis
MBP	=	Myelin Basic Protein
MAG	=	Myelin-associated Glycoprotein
NBB	=	Netherlands Brain Bank
NO	=	Nitric Oxide
PDGFs	=	Platelet-derived Growth Factors
PET	=	Positron Emission Tomography
PLP	=	Proteolipid Protein
SDT	=	Symbol-digit Test
TLRs	=	Toll-like Receptors
TGFs	=	Transforming Growth Factors
TNF- α	=	Tumor Necrosis Factor-alpha
VEGFs	=	Vascular Endothelial Growth Factors

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This work was supported by CNPq (grant number 441719/2020-1) and FAPEMIG (grant numbers APQ-03921-22, APQ-00140-23 and RED-00067-23) grants to F.M.R.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Mosser, C.A.; Baptista, S.; Arnoux, I.; Audinat, E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog. Neurobiol.*, **2017**, *149-150*, 1-20.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.01.002> PMID: 28143732
- [2] Ginhoux, F.; Greter, M.; Leboeuf, M.; Nandi, S.; See, P.; Gokhan, S.; Mehler, M.F.; Conway, S.J.; Ng, L.G.; Stanley, E.R.; Samokhvalov, I.M.; Merad, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, **2010**, *330*(6005), 841-845.

- <http://dx.doi.org/10.1126/science.1194637> PMID: 20966214
- [3] Bruttger, J.; Karam, K.; Wörtge, S.; Regen, T.; Marini, F.; Hoppmann, N.; Klein, M.; Blank, T.; Yona, S.; Wolf, Y.; Mack, M.; Pinteaux, E.; Müller, W.; Zipp, F.; Binder, H.; Bopp, T.; Prinz, M.; Jung, S.; Waisman, A. Genetic cell ablation reveals clusters of local self-renewing microglia in the mammalian central nervous system. *Immunity*, **2015**, *43*(1), 92-106.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012> PMID: 26163371
 - [4] Erbllich, B.; Zhu, L.; Etgen, A.M.; Dobrenis, K.; Pollard, J.W. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One*, **2011**, *6*(10), e26317.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026317> PMID: 22046273
 - [5] Spittau, B.; Dokalis, N.; Prinz, M. The role of TGF β signaling in microglia maturation and activation. *Trends Immunol.*, **2020**, *41*(9), 836-848.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2020.07.003> PMID: 32741652
 - [6] Gosselin, D.; Skola, D.; Coufal, N.G.; Holtman, I.R.; Schlachetzki, J.C.M.; Sajti, E.; Jaeger, B.N.; O'Connor, C.; Fitzpatrick, C.; Pasillas, M.P.; Pena, M.; Adair, A.; Gonda, D.D.; Levy, M.L.; Ransohoff, R.M.; Gage, F.H.; Glass, C.K. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, **2017**, *356*(6344), eaal3222.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aal3222> PMID: 28546318
 - [7] Distéfano-Gagné, F.; Bitarafan, S.; Lacroix, S.; Gosselin, D. Roles and regulation of microglia activity in multiple sclerosis: Insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2023**, *24*(7), 397-415.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41583-023-00709-6> PMID: 37268822
 - [8] Lawson, L.J.; Perry, V.H.; Dri, P.; Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, **1990**, *39*(1), 151-170.
[http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-W](http://dx.doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-W) PMID: 2089275
 - [9] Askew, K.; Li, K.; Olmos-Alonso, A.; Garcia-Moreno, F.; Liang, Y.; Richardson, P.; Tipton, T.; Chapman, M.A.; Riecken, K.; Becari, S.; Sierra, A.; Molnár, Z.; Cragg, M.S.; Garaschuk, O.; Perry, V.H.; Gomez-Nicola, D. Coupled proliferation and apoptosis maintain the rapid turnover of microglia in the adult brain. *Cell Rep.*, **2017**, *18*(2), 391-405.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.041> PMID: 28076784
 - [10] Plemel, J.R.; Stratton, J.A.; Michaels, N.J.; Rawji, K.S.; Zhang, E.; Sinha, S.; Baaklini, C.S.; Dong, Y.; Ho, M.; Thorburn, K.; Friedman, T.N.; Jawad, S.; Silva, C.; Caprariello, A.V.; Hoghooghi, V.; Yue, J.; Jaffer, A.; Lee, K.; Kerr, B.J.; Midha, R.; Stys, P.K.; Biernaskie, J.; Yong, V.W. Microglia response following acute demyelination is heterogeneous and limits infiltrating macrophage dispersion. *Sci. Adv.*, **2020**, *6*(3), eaay6324.
<http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.aay6324> PMID: 31998844
 - [11] Djalali, S.; Hölte, M.; Große, G.; Rothe, T.; Stroh, T.; Große, J.; Deng, D.R.; Hellweg, R.; Grantyn, R.; Hörtnagl, H.; Ahnert-Hilger, G. Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on glial cells and serotonergic neurones during development. *J. Neurochem.*, **2005**, *92*(3), 616-627.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02911.x> PMID: 15659231
 - [12] Włodarczyk, A.; Holtman, I.R.; Krueger, M.; Yogeve, N.; Bruttger, J.; Khoroshii, R.; Benmamar-Badel, A.; de Boer-Bergsma, J.J.; Martin, N.A.; Karam, K.; Kramer, I.; Boddeke, E.W.G.M.; Waisman, A.; Eggen, B.J.L.; Owens, T. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *EMBO J.*, **2017**, *36*(22), 3292-3308.
<http://dx.doi.org/10.15252/embj.201696056> PMID: 28963396
 - [13] Parkhurst, C.N.; Yang, G.; Ninan, I.; Savas, J.N.; Yates, J.R., III; Lafaille, J.J.; Hempstead, B.L.; Littman, D.R.; Gan, W.B. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, **2013**, *155*(7), 1596-1609.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030> PMID: 24360280
 - [14] Prinz, M.; Masuda, T.; Wheeler, M.A.; Quintana, F.J. Microglia and central nervous system-associated macrophages—from origin to disease modulation. *Annu. Rev. Immunol.*, **2021**, *39*(1), 251-277.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159> PMID: 33556248
 - [15] Hickman, S.E.; Kingery, N.D.; Ohsumi, T.K.; Borowsky, M.L.; Wang, L.; Means, T.K.; El Khoury, J. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat. Neurosci.*, **2013**, *16*(12), 1896-1905.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3554> PMID: 24162652
 - [16] Färber, K.; Kettenmann, H. Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*, **2006**, *54*(7), 656-665.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.20412> PMID: 17006894
 - [17] El Khoury, J.B.; Moore, K.J.; Means, T.K.; Leung, J.; Terada, K.; Toft, M.; Freeman, M.W.; Luster, A.D. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J. Exp. Med.*, **2003**, *197*(12), 1657-1666.
<http://dx.doi.org/10.1084/jem.20021546> PMID: 12796468
 - [18] Hickman, S.; Izzy, S.; Sen, P.; Morsett, L.; El Khoury, J. Microglia in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.*, **2018**, *21*(10), 1359-1369.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x> PMID: 30258234
 - [19] Umpierre, A.D.; Wu, L.J. How microglia sense and regulate neuronal activity. *Glia*, **2021**, *69*(7), 1637-1653.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.23961> PMID: 33369790
 - [20] Wendimu, M.Y.; Hooks, S.B. Microglia phenotypes in aging and neurodegenerative diseases. *Cells*, **2022**, *11*(13), 2091.
<http://dx.doi.org/10.3390/cells11132091> PMID: 35805174
 - [21] Gao, C.; Jiang, J.; Tan, Y.; Chen, S. Microglia in neurodegenerative diseases: Mechanism and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **2023**, *8*(1), 359.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41392-023-01588-0> PMID: 37735487
 - [22] Tang, Y.; Le, W. Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Mol. Neurobiol.*, **2016**, *53*(2), 1181-1194.
<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5> PMID: 25598354
 - [23] Liddelow, S.A.; Guttenplan, K.A.; Clarke, L.E.; Bennett, F.C.; Bohlen, C.J.; Schirmer, L.; Bennett, M.L.; Münch, A.E.; Chung, W.S.; Peterson, T.C.; Wilton, D.K.; Frouin, A.; Napier, B.A.; Panicker, N.; Kumar, M.; Buckwalter, M.S.; Rowitch, D.H.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M.; Stevens, B.; Barres, B.A. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, **2017**, *541*(7638), 481-487.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature21029> PMID: 28099414
 - [24] Ransohoff, R.M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.*, **2016**, *19*(8), 987-991.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.4338> PMID: 27459405
 - [25] Lassmann, H.; van Horssen, J.; Mahad, D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.*, **2012**, *8*(11), 647-656.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168> PMID: 23007702
 - [26] van der Poel, M.; Ulas, T.; Mizec, M.R.; Hsiao, C.C.; Miedema, S.S.M.; Adelia, S.K.G.; Helder, B.; Tas, S.W.; Schultze, J.L.; Hamann, J.; Huitinga, I. Transcriptional profiling of human microglia reveals grey-white matter heterogeneity and multiple sclerosis-associated changes. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*(1), 1139.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-08976-7> PMID: 30867424
 - [27] Nimmerjahn, A.; Kirchhoff, F.; Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, **2005**, *308*(5726), 1314-1318.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1110647> PMID: 15831717
 - [28] Hellwig, S.; Brioschi, S.; Dieni, S.; Frings, L.; Masuch, A.; Blank, T.; Biber, K. Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice. *Brain Behav. Immun.*, **2016**, *55*, 126-137.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2015.11.008> PMID: 26576722
 - [29] Hui, C.W.; St-Pierre, M.K.; Detuncq, J.; Aumailley, L.; Dubois, M.J.; Couture, V.; Skuk, D.; Marette, A.; Tremblay, J.P.; Lebel, M.; Tremblay, M.E. Nonfunctional mutant Wm protein leads to neurological deficits, neuronal stress, microglial alteration, and immune imbalance in a mouse model of Werner syndrome. *Brain Behav. Immun.*, **2018**, *73*, 450-469.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2018.06.007> PMID: 29908963
 - [30] Keren-Shaul, H.; Spinrad, A.; Weiner, A.; Matcovitch-Natan, O.; Dvir-Szternfeld, R.; Ulland, T.K.; David, E.; Baruch, K.; Lara-Astaiso, D.; Toth, B.; Itzkovitz, S.; Colonna, M.; Schwartz, M.; Amit, I. A Unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, **2017**, *169*(7), 1276-1290.e17.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018> PMID: 28602351
 - [31] Lee, D.C.; Rizer, J.; Selenica, M.L.B.; Reid, P.; Kraft, C.; Johnson, A.; Blair, L.; Gordon, M.N.; Dickey, C.A.; Morgan, D. LPS- in-

- duced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice. *J. Neuroinflammation*, **2010**, 7(1), 56.
<http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-7-56> PMID: 20846376
- [32] Andreadou, M.; Ingelfinger, F.; De Feo, D.; Cramer, T.L.M.; Tuzlak, S.; Friebe, E.; Schreiner, B.; Eede, P.; Schneeberger, S.; Geesdorf, M.; Ridder, F.; Welsh, C.A.; Power, L.; Kirschenbaum, D.; Tyagarajan, S.K.; Greter, M.; Heppner, F.L.; Mundt, S.; Becher, B. IL-12 sensing in neurons induces neuroprotective CNS tissue adaptation and attenuates neuroinflammation in mice. *Nat. Neurosci.*, **2023**, 26(10), 1701-1712.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-023-01435-z> PMID: 37749256
- [33] Cossburn, M.; Ingram, G.; Hirst, C.; Ben-Shlomo, Y.; Pickersgill, T.P.; Robertson, N.P. Age at onset as a determinant of presenting phenotype and initial relapse recovery in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, **2012**, 18(1), 45-54.
<http://dx.doi.org/10.1177/1352458511417479> PMID: 21865412
- [34] Olsson, T.; Barcellos, L.F.; Alfredsson, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.*, **2017**, 13(1), 25-36.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrneuro.2016.187> PMID: 27934854
- [35] Attfield, K.E.; Jensen, L.T.; Kaufmann, M.; Friese, M.A.; Fugger, L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.*, **2022**, 22(12), 734-750.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-022-00718-z> PMID: 35508809
- [36] Croxford, A.L.; Spath, S.; Becher, B. GM-CSF in neuroinflammation: Licensing myeloid cells for tissue damage. *Trends Immunol.*, **2015**, 36(10), 651-662.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.08.004> PMID: 26431942
- [37] Serafini, B.; Rosicarelli, B.; Magliozzi, R.; Stigliano, E.; Aloisi, F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.*, **2004**, 14(2), 164-174.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-3639.2004.tb00049.x> PMID: 15193029
- [38] Wekerle, H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity*, **2017**, 50(1), 57-60.
<http://dx.doi.org/10.1080/08916934.2017.1281914> PMID: 28166681
- [39] Yong, V.W. Microglia in multiple sclerosis: Protectors turn destroyers. *Neuron*, **2022**, 110(21), 3534-3548.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2022.06.023> PMID: 35882229
- [40] Fox, E.J. Immunopathology of multiple sclerosis. *Neurology*, **2004**, 63(12)(Suppl. 6), S3-S7.
 PMID: 15623668
- [41] Lublin, F.D.; Reingold, S.C.; Cohen, J.A.; Cutter, G.R.; Sorensen, P.S.; Thompson, A.J.; Wolinsky, J.S.; Balcer, L.J.; Banwell, B.; Barkhof, F.; Bebo, B., Jr; Calabresi, P.A.; Clanet, M.; Comi, G.; Fox, R.J.; Freedman, M.S.; Goodman, A.D.; Ingles, M.; Kappos, L.; Kieseier, B.C.; Lincoln, J.A.; Lubetzki, C.; Miller, A.E.; Montalban, X.; O'Connor, P.W.; Petkau, J.; Pozzilli, C.; Rudick, R.A.; Sormani, M.P.; Stüve, O.; Waubant, E.; Polman, C.H. Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*, **2014**, 83(3), 278-286.
<http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560> PMID: 24871874
- [42] Kalincik, T.; Buzzard, K.; Jokubaitis, V.; Trojano, M.; Duquette, P.; Izquierdo, G.; Girard, M.; Luges, A.; Grammond, P.; Grand'Maison, F.; Oreja-Guevara, C.; Boz, C.; Hupperts, R.; Petersen, T.; Giuliani, G.; Iuliano, G.; Lechner-Scott, J.; Barnett, M.; Bergamaschi, R.; Van Pesch, V.; Amato, M.P.; van Munster, E.; Fernandez-Bolanos, R.; Verheul, F.; Fiol, M.; Cristiano, E.; Slee, M.; Rio, M.E.; Spitaleri, D.; Alroughani, R.; Gray, O.; Saladino, M.L.; Flechter, S.; Herbert, J.; Cabrera-Gomez, J.A.; Vella, N.; Paine, M.; Shaw, C.; Moore, F.; Vucic, S.; Savino, A.; Singhal, B.; Petkovska-Boskova, T.; Parratt, J.; Sirbu, C.A.; Rozsa, C.; Liew, D.; Butzkueven, H. Risk of relapse phenotype recurrence in multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, **2014**, 20(11), 1511-1522.
<http://dx.doi.org/10.1177/1352458514528762> PMID: 24777276
- [43] Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; Fujihara, K.; Galetta, S.L.; Hartung, H.P.; Kappos, L.; Lublin, F.D.; Marrie, R.A.; Miller, A.E.; Miller, D.H.; Montalban, X.; Mowry, E.M.; Sorensen, P.S.; Tintoré, M.; Traboulsee, A.L.; Trojano, M.; Uitendaele, B.M.J.; Vukusic, S.; Waubant, E.; Weisk
- henker, B.G.; Reingold, S.C.; Cohen, J.A. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.*, **2018**, 17(2), 162-173.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2) PMID: 29275977
- [44] Müller, J.; Cagol, A.; Lorscheider, J.; Tsagkas, C.; Benkert, P.; Yaldizli, Ö.; Kuhle, J.; Derfuss, T.; Sormani, M.P.; Thompson, A.; Granziere, C.; Kappos, L. Harmonizing definitions for progression independent of relapse activity in multiple sclerosis. *JAMA Neurol.*, **2023**, 80(11), 1232-1245.
<http://dx.doi.org/10.1001/jamaneurol.2023.3331> PMID: 37782515
- [45] Galea, I.; Ward-Abel, N.; Heesen, C. Relapse in multiple sclerosis. *BMJ*, **2015**, 350, h1765.
<http://dx.doi.org/10.1136/bmj.h1765> PMID: 25872511
- [46] Lublin, F.D.; Häring, D.A.; Ganjgahi, H.; Ocampo, A.; Hatami, F.; Čuklina, J.; Aarden, P.; Dahlke, F.; Arnold, D.L.; Wiendl, H.; Chitnis, T.; Nichols, T.E.; Kieseier, B.C.; Bormel, R.A. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain*, **2022**, 145(9), 3147-3161.
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awac016> PMID: 35104840
- [47] Guerrero, B.L.; Sicotte, N.L. Microglia in multiple sclerosis: Friend or foe? *Front. Immunol.*, **2020**, 11, 374.
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00374> PMID: 32265902
- [48] Kuhlmann, T.; Ludwin, S.; Prat, A.; Antel, J.; Brück, W.; Lassmann, H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol.*, **2017**, 133(1), 13-24.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y> PMID: 27988845
- [49] Lucchinetti, C.; Brück, W.; Parisi, J.; Scheithauer, B.; Rodriguez, M.; Lassmann, H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.*, **2000**, 47(6), 707-717.
[http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q](http://dx.doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::AID-ANA3>3.0.CO;2-Q) PMID: 10852536
- [50] Frischer, J.M.; Weigand, S.D.; Guo, Y.; Kale, N.; Parisi, J.E.; Pirko, I.; Mandrekar, J.; Bramow, S.; Metz, I.; Brück, W.; Lassmann, H.; Lucchinetti, C.F. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann. Neurol.*, **2015**, 78(5), 710-721.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.24497> PMID: 26239536
- [51] Luchetti, S.; Fransen, N.L.; van Eden, C.G.; Ramaglia, V.; Mason, M.; Huitinga, I. Progressive multiple sclerosis patients show substantial lesion activity that correlates with clinical disease severity and sex: a retrospective autopsy cohort analysis. *Acta Neuropathol.*, **2018**, 135(4), 511-528.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-018-1818-y> PMID: 29441412
- [52] Zhang, X.; Chen, F.; Sun, M.; Wu, N.; Liu, B.; Yi, X.; Ge, R.; Fan, X. Microglia in the context of multiple sclerosis. *Front. Neurol.*, **2023**, 14, 1157287.
<http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2023.1157287> PMID: 37360338
- [53] Matejuk, A.; Ransohoff, R.M. Crosstalk between astrocytes and microglia: An overview. *Front. Immunol.*, **2020**, 11, 1416.
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416> PMID: 32765501
- [54] Marinelli, S.; Basilico, B.; Marrone, M.C.; Ragozzino, D. Microglia-neuron crosstalk: Signaling mechanism and control of synaptic transmission. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **2019**, 94, 138-151.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semedb.2019.05.017> PMID: 31112798
- [55] Allen, N.J.; Lyons, D.A. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science*, **2018**, 362(6411), 181-185.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aat0473> PMID: 30309945
- [56] Frost, J.L.; Schafer, D.P. Microglia: Architects of the developing nervous system. *Trends Cell Biol.*, **2016**, 26(8), 587-597.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006> PMID: 27004698
- [57] Liu, Y.J.; Spangenberg, E.E.; Tang, B.; Holmes, T.C.; Green, K.N.; Xu, X. Microglia elimination increases neural circuit connectivity and activity in adult mouse cortex. *J. Neurosci.*, **2021**, 41(6), 1274-1287.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2140-20.2020> PMID: 33380470
- [58] Ronzano, R.; Roux, T.; Thetiot, M.; Aigrot, M.S.; Richard, L.; Lejeune, F.X.; Mazuir, E.; Vallat, J.M.; Lubetzki, C.; Desmazières, A. Microglia-neuron interaction at nodes of Ranvier depends on neuronal activity through potassium release and contributes to remyelination. *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1), 5219.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-25486-7> PMID: 34471138

- [59] Zhou, M.; Cornell, J.; Salinas, S.; Huang, H.-Y. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regen. Res.*, **2022**, *17*(4), 705-716.
<http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.322423> PMID: 34472455
- [60] Lyons, A.; Downer, E.J.; Crotty, S.; Nolan, Y.M.; Mills, K.H.G.; Lynch, M.A. CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation *in vivo* and *in vitro*: A role for IL-4. *J. Neurosci.*, **2007**, *27*(31), 8309-8313.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1781-07.2007> PMID: 17670977
- [61] Dissing-Olesen, L.; LeDue, J.M.; Rungta, R.L.; Hefendehl, J.K.; Choi, H.B.; MacVicar, B.A. Activation of neuronal NMDA receptors triggers transient ATP-mediated microglial process outgrowth. *J. Neurosci.*, **2014**, *34*(32), 10511-10527.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0405-14.2014> PMID: 25100586
- [62] Centonze, D.; Muzio, L.; Rossi, S.; Cavasinni, F.; De Chiara, V.; Bergami, A.; Musella, A.; D'Amelio, M.; Cavallucci, V.; Martorana, A.; Bergamaschi, A.; Cencioni, M.T.; Diamantini, A.; Butti, E.; Comi, G.; Bernardi, G.; Ceconi, F.; Battistini, L.; Furlan, R.; Martino, G. Inflammation triggers synaptic alteration and degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci.*, **2009**, *29*(11), 3442-3452.
<http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5804-08.2009> PMID: 19295150
- [63] Di Filippo, M.; de Iure, A.; Giampà, C.; Chiasserini, D.; Tozzi, A.; Orvietani, P.L.; Ghiglieri, V.; Tantucci, M.; Durante, V.; Quiroga-Varela, A.; Mancini, A.; Costa, C.; Sarchielli, P.; Fusco, F.R.; Calabresi, P. Persistent activation of microglia and NADPH oxidase drive hippocampal dysfunction in experimental multiple sclerosis. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*(1), 20926.
<http://dx.doi.org/10.1038/srep20926> PMID: 26887636
- [64] Musella, A.; Gentile, A.; Guadalupi, L.; Rizzo, F.R.; De Vito, F.; Fresegna, D.; Bruno, A.; Dolcetti, E.; Vanni, V.; Vitiello, L.; Bullitta, S.; Sanna, K.; Caioli, S.; Balletta, S.; Nencini, M.; Buttari, F.; Stampanoni, B.M.; Centonze, D.; Mandolesi, G. Central modulation of selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 ameliorates experimental multiple sclerosis. *Cells*, **2020**, *9*(5), 1290.
<http://dx.doi.org/10.3390/cells9051290> PMID: 32455907
- [65] Gentile, A.; Musella, A.; De Vito, F.; Fresegna, D.; Bullitta, S.; Rizzo, F.R.; Centonze, D.; Mandolesi, G. Laquinimod ameliorates excitotoxic damage by regulating glutamate re-uptake. *J. Neuroinflammation*, **2018**, *15*(1), 5.
<http://dx.doi.org/10.1186/s12974-017-1048-6> PMID: 29304807
- [66] Rossi, S.; Lo Giudice, T.; De Chiara, V.; Musella, A.; Studer, V.; Motta, C.; Bernardi, G.; Martino, G.; Furlan, R.; Martorana, A.; Centonze, D. Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br. J. Pharmacol.*, **2012**, *165*(4), 861-869.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01579.x> PMID: 21740406
- [67] Parodi, B.; Rossi, S.; Morando, S.; Cordano, C.; Bragioni, A.; Motta, C.; Usai, C.; Wipke, B.T.; Scannevin, R.H.; Mancardi, G.L.; Centonze, D.; Kerlero de Rosbo, N.; Uccelli, A. Fumarates modulate microglia activation through a novel HCAR2 signaling pathway and rescue synaptic dysregulation in inflamed CNS. *Acta Neuropathol.*, **2015**, *130*(2), 279-295.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-015-1422-3> PMID: 25920452
- [68] Linnerbauer, M.; Wheeler, M.A.; Quintana, F.J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron*, **2020**, *108*(4), 608-622.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2020.08.012> PMID: 32898475
- [69] Norden, D.M.; Fenn, A.M.; Dugan, A.; Godbout, J.P. TGF β produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*, **2014**, *62*(6), 881-895.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.22647> PMID: 24616125
- [70] Sen, M.K.; Mahns, D.A.; Coorsen, J.R.; Shortland, P.J. The roles of microglia and astrocytes in phagocytosis and myelination: Insights from the cuprizone model of multiple sclerosis. *Glia*, **2022**, *70*(7), 1215-1250.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.24148> PMID: 35107839
- [71] Hagemeyer, N.; Hanft, K.M.; Akriditou, M.A.; Unger, N.; Park, E.S.; Stanley, E.R.; Staszewski, O.; Dimou, L.; Prinz, M. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol.*, **2017**, *134*(3), 441-458.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-017-1747-1> PMID: 28685323
- [72] Psenicka, M.W.; Smith, B.C.; Tinkley, R.A.; Williams, J.L. Connecting neuroinflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis: are oligodendrocyte precursor cells a nexus of disease? *Front. Cell. Neurosci.*, **2021**, *15*, 654284.
<http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2021.654284> PMID: 34234647
- [73] Kalafatakis, I.; Karageorgos, D. Oligodendrocytes and microglia: Key players in myelin development, damage and repair. *Biomolecules*, **2021**, *11*(7), 1058.
<http://dx.doi.org/10.3390/biom11071058> PMID: 34356682
- [74] van Horssen, J.; Singh, S.; van der Pol, S.; Kipp, M.; Lim, J.L.; Peferoen, L.; Gerritsen, W.; Kooi, E.J.; Witte, M.E.; Geurts, J.J.G.; de Vries, H.E.; Peferoen-Baert, R.; van den Elsen, P.J.; van der Valk, P.; Amor, S. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *J. Neuroinflammation*, **2012**, *9*(1), 602.
<http://dx.doi.org/10.1186/1742-2094-9-156> PMID: 22747960
- [75] Fünfschilling, U.; Supplie, L.M.; Mahad, D.; Boretius, S.; Saab, A.S.; Edgar, J.; Brinkmann, B.G.; Kassmann, C.M.; Tzvetanova, I.D.; Möbius, W.; Diaz, F.; Meijer, D.; Suter, U.; Hamprecht, B.; Sereda, M.W.; Moraes, C.T.; Frahm, J.; Goebbels, S.; Nave, K.A. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, **2012**, *485*(7399), 517-521.
<http://dx.doi.org/10.1038/nature11007> PMID: 22622581
- [76] Saab, A.S.; Tzvetanova, I.D.; Trevisiol, A.; Baltan, S.; Dibaj, P.; Kusch, K.; Möbius, W.; Goetze, B.; Jahn, H.M.; Huang, W.; Steffens, H.; Schomburg, E.D.; Pérez-Samartín, A.; Pérez-Cerdá, F.; Bakhtiari, D.; Matute, C.; Löwel, S.; Griesinger, C.; Hirrlinger, J.; Kirchhoff, F.; Nave, K.A. Oligodendroglial NMDA receptors regulate glucose import and axonal energy metabolism. *Neuron*, **2016**, *91*(1), 119-132.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.016> PMID: 27292539
- [77] Simons, M.; Nave, K.A. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2016**, *8*(1), a020479.
<http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a020479> PMID: 26101081
- [78] Boukhvalova, M.S.; Kastrukoff, L.; Blanco, J.C.G. Alzheimer's disease and multiple sclerosis: A possible connection through the viral demyelinating neurodegenerative trigger (vDENT). *Front. Aging Neurosci.*, **2023**, *15*, 1204852.
<http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2023.1204852> PMID: 37396655
- [79] Poon, K.W.C.; Brideau, C.; Klaver, R.; Schenk, G.J.; Geurts, J.J.; Stys, P.K. Lipid biochemical changes detected in normal appearing white matter of chronic multiple sclerosis by spectral coherent Raman imaging. *Chem. Sci. (Camb.)*, **2018**, *9*(6), 1586-1595.
<http://dx.doi.org/10.1039/C7SC03992A> PMID: 29675203
- [80] Traka, M.; Podojil, J.R.; McCarthy, D.P.; Miller, S.D.; Popko, B. Oligodendrocyte death results in immune-mediated CNS demyelination. *Nat. Neurosci.*, **2016**, *19*(1), 65-74.
<http://dx.doi.org/10.1038/nn.4193> PMID: 26656646
- [81] Erik, S.; Mar, Bosch-Queralt, Julia, M.E.; Maria, L.; Judith, S.; Niko, F.; Theresa, K.; Peter, W.; Stefan, A.B.; Tilo, R.; Martin, K.; Markus, M.; Wiebke, M.; Alonso, Barrantes-Freer, Jens, S.; Ting, S.; Gesine, S.; Markus, H.S.; Christoph, W.; Maximilian, F.; Marco, P.; Daniel, S.R.; Alexander, F.; Christine, S.; Robert, F.; Klaus-Armin, N.; Ruth, M.S. Myelin insulation as a risk factor for axonal degeneration in autoimmune demyelinating disease. *Nat. Neurosci.*, **2023**, *26*(7), 1218-1228.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-023-01366-9>
- [82] Chapman, T.W.; Olveda, G.E.; Bame, X.; Pereira, E.; Hill, R.A. Oligodendrocyte death initiates synchronous remyelination to restore cortical myelin patterns in mice. *Nat. Neurosci.*, **2023**, *26*(4), 555-569.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-023-01271-1> PMID: 36928635
- [83] Romanelli, E.; Merkler, D.; Mezydło, A.; Weil, M.T.; Weber, M.S.; Nikić, I.; Potz, S.; Meinel, E.; Matznick, F.E.H.; Kreutzfeldt, M.; Ghanem, A.; Conzelmann, K.K.; Metz, I.; Brück, W.; Routh, M.; Simons, M.; Bishop, D.; Misgeld, T.; Kerscheneiter, M. Myelinosome formation represents an early stage of oligodendrocyte damage in multiple sclerosis and its animal model. *Nat. Commun.*, **2016**, *7*(1), 13275.
<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms13275> PMID: 27848954

- [84] Aber, E.R.; Griffey, C.J.; Davies, T.; Li, A.M.; Yang, Y.J.; Croce, K.R.; Goldman, J.E.; Grutzendler, J.; Canman, J.C.; Yamamoto, A. Oligodendroglial macroautophagy is essential for myelin sheath turnover to prevent neurodegeneration and death. *Cell Rep.*, **2022**, *41*(3), 111480.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111480> PMID: 36261002
- [85] Franklin, R.J.M.; French-Constant, C. Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat. Rev. Neurosci.*, **2017**, *18*(12), 753-769.
<http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2017.136> PMID: 29142295
- [86] Lubetzki, C.; Zalc, B.; Williams, A.; Stadelmann, C.; Stankoff, B. Remyelination in multiple sclerosis: From basic science to clinical translation. *Lancet Neurol.*, **2020**, *19*(8), 678-688.
[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30140-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30140-X) PMID: 32702337
- [87] Kremer, D.; Aktas, O.; Hartung, H.P.; Kury, P. The complex world of oligodendroglial differentiation inhibitors. *Ann. Neurol.*, **2011**, *69*(4), 602-618.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.22415> PMID: 21520230
- [88] Gruchot, J.; Weyers, V.; Göttele, P.; Förster, M.; Hartung, H.P.; Kury, P.; Kremer, D. The molecular basis for remyelination failure in multiple sclerosis. *Cells*, **2019**, *8*(8), 825.
<http://dx.doi.org/10.3390/cells8080825> PMID: 31382620
- [89] Kuhlmann, T.; Miron, V.; Cuo, Q.; Wegner, C.; Antel, J.; Brück, W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain*, **2008**, *131*(7), 1749-1758.
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn096> PMID: 18515322
- [90] Yu, Z.; Fang, X.; Liu, W.; Sun, R.; Zhou, J.; Pu, Y.; Zhao, M.; Sun, D.; Xiang, Z.; Liu, P.; Ding, Y.; Cao, L.; He, C. Microglia regulate blood-brain barrier integrity via MiR-126a-5p/MMP9 axis during inflammatory demyelination. *Adv. Sci. (Weinh.)*, **2022**, *9*(24), 2105442.
<http://dx.doi.org/10.1002/advs.202105442> PMID: 35758549
- [91] Jie, Z.; Ko, C.J.; Wang, H.; Xie, X.; Li, Y.; Gu, M.; Zhu, L.; Yang, J.Y.; Gao, T.; Ru, W.; Tang, S.J.; Cheng, X.; Sun, S.C. Microglia promote autoimmune inflammation via the noncanonical NF- κ B pathway. *Sci. Adv.*, **2021**, *7*(36), eabh0609.
<http://dx.doi.org/10.1126/sciadv.abh0609> PMID: 34516909
- [92] Marzan, D.E.; Brügger-Verdon, V.; West, B.L.; Liddel, S.; Samanta, J.; Salzer, J.L. Activated microglia drive demyelination via CSF1R signaling. *Glia*, **2021**, *69*(6), 1583-1604.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.23980> PMID: 33620118
- [93] Beckmann, N.; Giorgetti, E.; Neuhaus, A.; Zurbrugg, S.; Accart, N.; Smith, P.; Perdoux, J.; Perrot, L.; Nash, M.; Desrayaud, S.; Wipfli, P.; Friauff, W.; Shimshek, D.R. Brain region-specific enhancement of remyelination and prevention of demyelination by the CSF1R kinase inhibitor BLZ945. *Acta Neuropathol. Commun.*, **2018**, *6*(1), 9.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40478-018-0510-8> PMID: 29448957
- [94] Tahmasebi, F.; Pasbakhsh, P.; Mortezaee, K.; Madadi, S.; Barati, S.; Kashani, I.R. Effect of the CSF1R inhibitor PLX3397 on remyelination of corpus callosum in a cuprizone-induced demyelination mouse model. *J. Cell. Biochem.*, **2019**, *120*(6), 10576-10586.
<http://dx.doi.org/10.1002/jcb.28344> PMID: 30628737
- [95] Tanabe, S.; Saitoh, S.; Miyajima, H.; Itokazu, T.; Yamashita, T. Microglia suppress the secondary progression of autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, **2019**, *67*(9), 1694-1704.
<http://dx.doi.org/10.1002/glia.23640> PMID: 31106910
- [96] Kent, S.A.; Miron, V.E. Microglia regulation of central nervous system myelin health and regeneration. *Nat. Rev. Immunol.*, **2024**, *24*(1), 49-63.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-023-00907-4> PMID: 37452201
- [97] Cantuti-Castelvetri, L.; Fitzner, D.; Bosch-Queralt, M.; Weil, M.T.; Su, M.; Sen, P.; Ruhwedel, T.; Mitkovski, M.; Trendelenburg, G.; Lütjohann, D.; Möbius, W.; Simons, M. Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science*, **2018**, *359*(6376), 684-688.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.aan4183> PMID: 29301957
- [98] Hametner, S.; Wimmer, I.; Haider, L.; Pfeifenbring, S.; Brück, W.; Lassmann, H. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.*, **2013**, *74*(6), 848-861.
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.23974> PMID: 23868451
- [99] Bagnato, F.; Hametner, S.; Yao, B.; van Gelderen, P.; Merkle, H.; Cantor, F.K.; Lassmann, H.; Duyn, J.H. Tracking iron in multiple sclerosis: A combined imaging and histopathological study at 7 Tesla. *Brain*, **2011**, *134*(12), 3602-3615.
<http://dx.doi.org/10.1093/brain/awr278> PMID: 22171355
- [100] Mehta, V.; Pei, W.; Yang, G.; Li, S.; Swamy, E.; Boster, A.; Schmalbrock, P.; Pitt, D. Iron is a sensitive biomarker for inflammation in multiple sclerosis lesions. *PLoS One*, **2013**, *8*(3), e57573.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057573> PMID: 23516409
- [101] Gillen, K.M.; Mubarak, M.; Nguyen, T.D.; Pitt, D. Significance and *in vivo* detection of iron-laden microglia in white matter multiple sclerosis lesions. *Front. Immunol.*, **2018**, *9*, 255.
<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00255> PMID: 29515576
- [102] Neema, M.; Arora, A.; Healy, B.C.; Guss, Z.D.; Brass, S.D.; Duan, Y.; Buckle, G.J.; Glanz, B.I.; Stazzone, L.; Khoury, S.J.; Weiner, H.L.; Guttmann, C.R.G.; Bakshi, R. Deep gray matter involvement on brain MRI scans is associated with clinical progression in multiple sclerosis. *J. Neuroimaging*, **2009**, *19*(1), 3-8.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1552-6569.2008.00296.x> PMID: 19192042
- [103] Stüber, C.; Pitt, D.; Wang, Y. Iron in multiple sclerosis and its noninvasive imaging with quantitative susceptibility mapping. *Int. J. Mol. Sci.*, **2016**, *17*(1), 100.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms17010100> PMID: 26784172
- [104] Lloyd, A.F.; Miron, V.E. The pro-remyelination properties of microglia in the central nervous system. *Nat. Rev. Neurol.*, **2019**, *15*(8), 447-458.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0184-2> PMID: 31256193
- [105] Yeung, M.S.Y.; Djelloul, M.; Steiner, E.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Possnert, G.; Brundin, L.; Frisén, J. Dynamics of oligodendrocyte generation in multiple sclerosis. *Nature*, **2019**, *566*(7745), 538-542.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0842-3> PMID: 30675058
- [106] Berghoff, S.A.; Spieth, L.; Saher, G. Local cholesterol metabolism orchestrates remyelination. *Trends Neurosci.*, **2022**, *45*(4), 272-283.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tins.2022.01.001> PMID: 35153084
- [107] Berghoff, S.A.; Spieth, L.; Sun, T.; Hosang, L.; Schlaphoff, L.; Depp, C.; Düking, T.; Winchenbach, J.; Neuber, J.; Ewers, D.; Scholz, P.; van der Meer, F.; Cantuti-Castelvetri, L.; Sasmita, A.O.; Meschkat, M.; Ruhwedel, T.; Möbius, W.; Sankowski, R.; Prinz, M.; Huitinga, I.; Sereda, M.W.; Odoardi, F.; Ischebeck, T.; Simons, M.; Stadelmann-Nessler, C.; Edgar, J.M.; Nave, K.A.; Saher, G. Microglia facilitate repair of demyelinated lesions via post-squalene sterol synthesis. *Nat. Neurosci.*, **2021**, *24*(1), 47-60.
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-020-00757-6> PMID: 33349711
- [108] Cannon, A.S.; Nagarkatti, P.S.; Nagarkatti, M. Targeting AHR as a novel therapeutic modality against inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, *23*(1), 288.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms23010288> PMID: 35008717
- [109] Neavin, D.R.; Liu, D.; Ray, B.; Weinsilboum, R.M. The role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in immune and inflammatory diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19*(12), 3851.
<http://dx.doi.org/10.3390/ijms19123851> PMID: 30513921
- [110] Wang, Y.; Liu, T. Quantitative susceptibility mapping (QSM): Decoding MRI data for a tissue magnetic biomarker. *Magn. Reson. Med.*, **2015**, *73*(1), 82-101.
<http://dx.doi.org/10.1002/mrm.25358> PMID: 25044035
- [111] Cignarella, F.; Filippello, F.; Bollman, B.; Cantoni, C.; Locca, A.; Mikesell, R.; Manis, M.; Ibrahim, A.; Deng, L.; Benitez, B.A.; Cruchaga, C.; Licastro, D.; Mihindukulasuriya, K.; Harari, O.; Buckland, M.; Holtzman, D.M.; Rosenthal, A.; Schwabe, T.; Tassi, I.; Piccio, L. TREM2 activation on microglia promotes myelin debris clearance and remyelination in a model of multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.*, **2020**, *140*(4), 513-534.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00401-020-02193-z> PMID: 32772264
- [112] Baaklini, C.S.; Ho, M.F.S.; Lange, T.; Hammond, B.P.; Panda, S.P.; Zirnigbl, M.; Zia, S.; Himmelsbach, K.; Rana, H.; Phillips, B.; Antoszko, D.; Ibanga, J.; Lopez, M.; Lee, K.V.; Keough, M.B.; Capriello, A.V.; Kerr, B.J.; Plemel, J.R. Microglia promote remyelination independent of their role in clearing myelin debris. *Cell Rep.*, **2023**, *42*(12), 113574.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2023.113574> PMID: 38100356

- [113] Groh, J.; Abdelwahab, T.; Kattimani, Y.; Hömer, M.; Loserth, S.; Gudi, V.; Adalbert, R.; Imdahl, F.; Saliba, A.E.; Coleman, M.; Stangel, M.; Simons, M.; Martini, R. Microglia-mediated demyelination protects against CD8⁺ T cell-driven axon degeneration in mice carrying PLP defects. *Nat. Commun.*, **2023**, *14*(1), 6911. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-42570-2> PMID: 37903797
- [114] Dal-Bianco, A.; Grabner, G.; Kronnerwetter, C.; Weber, M.; Höftberger, R.; Berger, T.; Auff, E.; Leutmezer, F.; Tractnig, S.; Lassmann, H.; Bagnato, F.; Hametner, S. Slow expansion of multiple sclerosis iron rim lesions: Pathology and 7 T magnetic resonance imaging. *Acta Neuropathol.*, **2017**, *133*(1), 25–42. <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-016-1636-z> PMID: 27796537
- [115] Absinta, M.; Maric, D.; Gharagozloo, M.; Garton, T.; Smith, M.D.; Jin, J.; Fitzgerald, K.C.; Song, A.; Liu, P.; Lin, J.P.; Wu, T.; Johnson, K.R.; McGavern, D.B.; Schafer, D.P.; Calabresi, P.A.; Reich, D.S. A lymphocyte-microglia-astrocyte axis in chronic active multiple sclerosis. *Nature*, **2021**, *597*(7878), 709–714. <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03892-7> PMID: 34497421
- [116] Airas, L.; Rissanen, E.; Rinne, J. Imaging of microglial activation in MS using PET: Research use and potential future clinical application. *Mult. Scler.*, **2017**, *23*(4), 496–504. <http://dx.doi.org/10.1177/1352458516674568> PMID: 27760860
- [117] Giannetti, P.; Politis, M.; Su, P.; Turkheimer, F.E.; Malik, O.; Keihaninejad, S.; Wu, K.; Waldman, A.; Reynolds, R.; Nicholas, R.; Piccini, P. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain*, **2015**, *138*(1), 110–119. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awu331> PMID: 25416179
- [118] Kaunzner, U.W.; Kang, Y.; Monohan, E.; Kothari, P.J.; Nealon, N.; Perumal, J.; Vartanian, T.; Kuceyeski, A.; Vallabhajosula, S.; Mozley, P.D.; Riley, C.S.; Newman, S.M.; Gauthier, S.A. Reduction of PK11195 uptake observed in multiple sclerosis lesions after natalizumab initiation. *Mult. Scler. Relat. Disord.*, **2017**, *15*, 27–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msard.2017.04.008> PMID: 28641769
- [119] Rissanen, E.; Tuisku, J.; Vahlberg, T.; Sucksdorff, M.; Paavilainen, T.; Parkkola, R.; Rokka, J.; Gerhard, A.; Hinz, R.; Talbot, P.S.; Rinne, J.O.; Airas, L. Microglial activation, white matter tract damage, and disability in MS. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **2018**, *5*(3), e443. <http://dx.doi.org/10.1212/NXI.0000000000000443> PMID: 29520366
- [120] Khalil, M.; Teunissen, C.E.; Otto, M.; Piehl, F.; Sormani, M.P.; Gatringer, T.; Barro, C.; Kappos, L.; Comabella, M.; Fazekas, F.; Petzold, A.; Blennow, K.; Zetterberg, H.; Kuhle, J. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat. Rev. Neurol.*, **2018**, *14*(10), 577–589. <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z> PMID: 30171200
- [121] Saraste, M.; Matilainen, M.; Vuorimaa, A.; Laaksonen, S.; Sucksdorff, M.; Leppert, D.; Kuhle, J.; Airas, L. Association of serum neurofilament light with microglial activation in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **2023**, *94*(9), 698–706. <http://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2023-331051> PMID: 37130728
- [122] Rommer, P.S.; Milo, R.; Han, M.H.; Satyanarayan, S.; Sellner, J.; Hauer, L.; Illes, Z.; Wamke, C.; Laurent, S.; Weber, M.S.; Zhang, Y.; Stuve, O. Immunological aspects of approved MS therapeutics. *Front. Immunol.*, **2019**, *10*, 1564. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2019.01564> PMID: 31354720
- [123] Healy, L.M.; Michell-Robinson, M.A.; Antel, J.P. Regulation of human glia by multiple sclerosis disease modifying therapies. *Semin. Immunopathol.*, **2015**, *37*(6), 639–649. <http://dx.doi.org/10.1007/s00281-015-0514-4> PMID: 26259734
- [124] Simonsen, C.S.; Flemmen, H.O.; Broch, L.; Brunborg, C.; Berg-Hansen, P.; Moen, S.M.; Celius, E.G. Early high efficacy treatment in multiple sclerosis is the best predictor of future disease activity over 1 and 2 years in a norwegian population-based registry. *Front. Neurol.*, **2021**, *12*, 693017. <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2021.693017> PMID: 34220694
- [125] Li, D.K.B.; Zhao, G.J.; Paty, D.W. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: MRI results. *Neurology*, **2001**, *56*(11), 1505–1513. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.56.11.1505> PMID: 11402107
- [126] Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: Clinical results. *Neurology*, **2001**, *56*(11), 1496–1504. <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.56.11.1496> PMID: 11402106
- [127] Krumbholz, M.; Faber, H.; Steinmeyer, F.; Hoffmann, L.A.; Kümpfel, T.; Pellkofer, H.; Derfuss, T.; Ionescu, C.; Starck, M.; Hafner, C.; Hohlfeld, R.; Meinl, E. Interferon- β increases BAFF levels in multiple sclerosis: Implications for B cell autoimmunity. *Brain*, **2008**, *131*(6), 1455–1463. <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awn077> PMID: 18474519
- [128] Moore, C.S.; Cui, Q.L.; Warsi, N.M.; Durafourt, B.A.; Zorko, N.; Owen, D.R.; Antel, J.P.; Bar-Or, A. Direct and indirect effects of immune and central nervous system-resident cells on human oligodendrocyte progenitor cell differentiation. *J. Immunol.*, **2015**, *194*(2), 761–772. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1401156> PMID: 25505283
- [129] Stoof, T.J.; Flier, J.; Sampat, S.; Nieboer, C.; Tensen, C.P.; Boorsma, D.M. The antipsoriatic drug dimethylfumarate strongly suppresses chemokine production in human keratinocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Br. J. Dermatol.*, **2001**, *144*(6), 1114–1120. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2133.2001.04220.x> PMID: 11422029
- [130] Huang, H.; Tarabotti, A.; Shriver, L.P. Dimethyl fumarate modulates antioxidant and lipid metabolism in oligodendrocytes. *Redox Biol.*, **2015**, *5*, 169–175. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.04.011> PMID: 25967672
- [131] Greene, S.; Watanabe, K.; Braatz-Trulsson, J.; Lou, L. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase by the immunosuppressive agent leflunomide. *Biochem. Pharmacol.*, **1995**, *50*(6), 861–867. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(95\)00255-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(95)00255-X) PMID: 7575649
- [132] Bar-Or, A.; Pachner, A.; Menguy-Vacheron, F.; Kaplan, J.; Wiendl, H. Teriflunomide and its mechanism of action in multiple sclerosis. *Drugs*, **2014**, *74*(6), 659–674. <http://dx.doi.org/10.1007/s40265-014-0212-x> PMID: 24740824
- [133] Foster, C.A.; Howard, L.M.; Schweitzer, A.; Persohn, E.; Hiestand, P.C.; Balatoni, B.; Reuschel, R.; Beerli, C.; Schwartz, M.; Billich, A. Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: Consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2007**, *323*(2), 469–475. <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.107.127183> PMID: 17682127
- [134] Kappos, L.; Radue, E.W.; O'Connor, P.; Polman, C.; Hohlfeld, R.; Calabresi, P.; Selmaj, K.; Agoropoulou, C.; Leyk, M.; Zhang-Auberson, L.; Burtin, P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.*, **2010**, *362*(5), 387–401. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0909494> PMID: 20089952
- [135] Lublin, F.; Miller, D.H.; Freedman, M.S.; Cree, B.A.C.; Wolinsky, J.S.; Weiner, H.; Lubetzki, C.; Hartung, H.P.; Montalban, X.; Uitendhaag, B.M.J.; Merschhemke, M.; Li, B.; Putzki, N.; Liu, F.C.; Häring, D.A.; Kappos, L. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): A phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, **2016**, *387*(10023), 1075–1084. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01314-8) PMID: 26827074
- [136] Pham, T.H.M.; Okada, T.; Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cyster, J.G. SIP1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity*, **2008**, *28*(1), 122–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.017> PMID: 18164221
- [137] Dev, K.K.; Mullershausen, F.; Mattes, H.; Kuhn, R.R.; Bilbe, G.; Hoyer, D.; Mir, A. Brain sphingosine-1-phosphate receptors: Implication for FTY720 in the treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.*, **2008**, *117*(1), 77–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.005> PMID: 17961662
- [138] Noda, H.; Takeuchi, H.; Mizuno, T.; Suzumura, A. Fingolimod phosphate promotes the neuroprotective effects of microglia. *J. Neuroimmunol.*, **2013**, *256*(1–2), 13–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.12.005> PMID: 23290828
- [139] Kappos, L.; Li, D.K.B.; Stüve, O.; Hartung, H.P.; Freedman, M.S.; Hemmer, B.; Rieckmann, P.; Montalban, X.; Ziemssen, T.; Hunter,