

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –  
BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SULFITO SOBRE A ESTRUTURA DA  
MIELINA E INFLAMAÇÃO EM ESTRIADO DE RATOS JOVENS**

**NÍCOLAS MANZKE GLÄNZEL  
Orientador: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ**

**Porto Alegre, 2018**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS –BIOQUÍMICA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SULFITO SOBRE A ESTRUTURA DA  
MIELINA E INFLAMAÇÃO EM ESTRIADO DE RATOS JOVENS**

**NÍCOLAS MANZKE GLÄNZEL**

**Orientador: Prof. Dr. GUILHIAN LEIPNITZ**

**Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica**

**Porto Alegre, 2018**

## CIP - Catalogação na Publicação

Glänzel, Nicolas Manzke

Efeitos da administração de sulfito sobre a estrutura da mielina e inflamação em estriado de ratos jovens / Nicolas Manzke Glänzel. -- 2018.

59 f.

Orientador: Guilhian Leipnitz.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Sulfito. 2. Bezafibrato. 3. Mielina. 4. Inflamação. 5. Estriado. I. Leipnitz, Guilhian, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, meus pais e irmão. Toda conquista minha tem uma grande parte de vocês. Obrigado pela educação, pelo incentivo à curiosidade, ao pensamento crítico, pelo apoio, pelo suporte.

Ao meu orientador, Guilhian, por ter aberto as portas deste departamento para mim. Obrigado por todo incentivo, pelos ensinamentos, pela amizade, por guiar nossa pesquisa sempre além.

Aos meus colegas de laboratório. Pela parceria, pela “mão”, por tudo que aprendi com vocês, como colegas, como amigos.

Agradeço aos colegas e amigos do Departamento de Bioquímica, essenciais em todos os momentos.

A todos os funcionários do Departamento, por toda atenção, dedicação, pelo esforço. Obrigado.

A todos aqueles que, de alguma forma, participaram da minha vida. Vocês fazem parte deste caminho até aqui.

Obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	2
ABSTRACT .....	3
LISTA DE ABREVIATURAS .....	4
LISTA DE FIGURAS.....	5
I.1. INTRODUÇÃO .....	6
1.1. Erros Inatos do Metabolismo.....	6
1.2. Sulfito oxidase (SO) .....	8
1.3. Deficiência da sulfito oxidase (SO).....	9
1.3.1. Sintomas e neuropatologia.....	10
1.3.2. Tratamento .....	11
1.3.3. Fisiopatologia.....	12
1.2. Mielina.....	13
1.3. Inflamação .....	16
1.4. Bezafibrato (BEZ) .....	18
I.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	19
2.1. Animais.....	19
2.2. Administração intraestriatal de sulfito.....	20
2.3. Tratamento com bezafibrato (BEZ).....	20
2.4. Imunohistoquímica e marcação com Fluoromielina .....	21
2.5. RT-PCR Quantitativo .....	22
I.3. OBJETIVOS .....	18
3.1. Objetivo geral .....	18
3.2. Objetivos específicos.....	19
II.1. RESULTADOS .....	25
1.1. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da Fluoromielina em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção de sulfito.....	25
1.2. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da MBP em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção de sulfito.....	27

1.3. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação de NG2 em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção de sulfito.....	29
1.4. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da Iba1 em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção.....	30
1.5. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito sobre os níveis do RNAm do TNF e da IL-1 $\beta$ , bem como do NF $\kappa$ B em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção .....	32
III.1. DISCUSSÃO.....	34
III.2. CONCLUSÕES.....	38
III.3. PERSPECTIVAS .....	39
REFERÊNCIAS .....	40

# **PARTE I**

## RESUMO

A deficiência da sulfito oxidase (SO) é um erro inato do metabolismo de herança autossômica causada pela deficiência isolada da enzima ou por defeitos na síntese do cofator molibdênio. A doença é bioquimicamente caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária predominantemente de sulfito. Os pacientes apresentam convulsões graves, anormalidades nos gânglios basais e desmielinização que frequentemente causam óbito nos primeiros meses de vida. Visto que a etiopatogenia do dano neurológico observado na deficiência da SO não está esclarecida, avaliamos os efeitos da administração intraestriatal de sulfito (2  $\mu$ mol) sobre parâmetros de estrutura e compactação da mielina e de inflamação em estriado de ratos jovens eutanasiados 7 dias após a administração. Além disso, visando contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa doença, avaliamos a influência da administração por gavagem de bezafibrato (BEZ; 30 ou 100 mg/kg/dia) realizada antes (pré-tratamento) ou depois (pós-tratamento) da injeção de sulfito. A administração de sulfito diminuiu os feixes de axônios no estriado, observado através da marcação da Fluoromielina, uma sonda com alta sensibilidade que marca áreas mielinizadas, e também a intensidade da marcação da proteína básica de mielina (MBP), um componente integral da mielina. O sulfito ainda aumentou a marcação de neuroglicano-2 (NG2), um marcador de células precursoras de oligodendrócitos, indicando indução de remielinização. Tanto o pré- quanto o pós-tratamento com BEZ atenuaram ou preveniram a diminuição dos feixes de axônios e a marcação da MBP, ao passo que o pós-tratamento preveniu o aumento da marcação do NG2. Além disso, foi observado que o sulfito aumentou a intensidade da marcação da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), e que o pós-tratamento com BEZ preveniu esse efeito. No que se refere aos parâmetros indicativos de processo inflamatório, o sulfito aumentou os níveis do RNAm do fator de transcrição NFkB, porém não modificou os níveis do RNAm das citocinas fator de necrose tumoral e interleucina-1 $\beta$ . Portanto, nossos resultados demonstram que o sulfito causa alterações na mielina e induz inflamação em estriado. Pode ser presumido que tais mecanismos patológicos contribuem, ao menos em parte, para as anormalidades e desmielinização dos gânglios basais observadas em pacientes com deficiência da SO. Já o fato de o BEZ ter prevenido alguns dos efeitos tóxicos do sulfito sugere que esse composto pode ser um potencial adjuvante a ser usado na terapia para a deficiência da SO.

*Palavras-chave:* Sulfito; Bezafibrato; Mielina; Inflamação; Estriado

## ABSTRACT

Sulfite oxidase (SO) deficiency is an autosomal recessive inborn error of metabolism caused either by the isolated deficiency of SO or by defects in the molybdenum cofactor synthesis. SO deficiency is biochemically characterized by predominant tissue accumulation and high urinary excretion of sulfite. Patients usually present severe seizures, basal ganglia abnormalities and demyelination that often lead to early death. Considering that the etiopathogenesis of the neurological dysfunction observed in SO deficiency is not totally established, we evaluated the effects of intrastriatal administration of sulfite on parameters of myelin compaction, structure, and inflammation in striatum of young rats euthanized 7 days after sulfite injection. Aiming to contribute for the development of novel therapeutic strategies for this disorder, we also evaluated the influence of bezafibrate (BEZ) administration (30 or 100 mg/kg/day) performed by gavage before (pre-treatment) or after (post-treatment) sulfite injection. Our results demonstrated that sulfite administration reduced axonal bundles in striatum, as observed with the Fluoromyelin probe that detects myelinating areas with high sensitivity. Sulfite also decreased the intensity of myelin basic protein (MBP) staining, an integral component of myelin, and increased neuroglycan-2 (NG2) staining, a marker of oligodendrocyte precursor cells. In addition, BEZ pre- and post-treatment prevented or attenuated the decrease of axonal bundles and MBP staining intensity caused by sulfite, whereas BEZ post-treatment prevented NG2 increase. Regarding the inflammation parameters, sulfite significantly increased the staining of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) while BEZ post-treatment prevented this effect. Furthermore, sulfite increased mRNA levels of NFkB, but did not alter of the cytokines tumor necrosis factor and interleukin-1 $\beta$ . Therefore, our findings showing that sulfite causes myelin alterations and inflammation in striatum of rats suggest that these pathomechanisms are involved, at least in part, in the abnormalities and demyelination observed in basal ganglia of SO deficient individuals. Moreover, since BEZ prevented some of the toxic effects exerted by sulfite, we suggest that this compound should be further investigated as a potential adjuvant therapy for SO deficiency.

*Keywords:* Sulfite; Bezafibrate; Myelin; Inflammation; Striatum.

## LISTA DE ABREVIATURAS

BEZ - Bezafibrato

cPMP - Piranopterina monofosfato cíclica

CPOs - Células precursoras de oligodendrócitos

DAMPs - Padrões moleculares associados a danos

EIM - Erros inatos do metabolismo

GFAP - Proteína ácida fibrilar glial

Iba1 - Molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 $\beta$

MAPK - Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MBP - Proteína básica de mielina

MoCo - Cofator molibdênio

NF $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B

NG2 - Neuroglicano-2

NRF1 - Fator nuclear respiratório

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PGC-1 $\alpha$  - Co-ativador  $\alpha$  do receptor ativado por proliferador de peroxissomo

PPARs - Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

S100B - Proteína ligadora de cálcio

SNC - Sistema nervoso central

SO - Sulfito oxidase

Tfam - Fator de transcrição mitocondrial A

TNF - Fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	8
Figura 2.....	9
Figura 3.....	23
Figura 4.....	24
Figura 5.....	25
Figura 6.....	27
Figura 7.....	28

## **I.1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Erros Inatos do Metabolismo**

Os Erros Inatos do Metabolismo (EIM) são um grupo heterogêneo de doenças, com variados fenótipos, causados por distúrbios metabólicos devido a mutações genéticas que levam à perda total ou parcial da atividade de uma enzima de uma determinada rota metabólica. Como consequência, tem-se o acúmulo de intermediários potencialmente tóxicos no organismo de pacientes e a deficiência de produtos essenciais (Bickel, 1987; Mak et al., 2013).

O termo EIM foi utilizado pela primeira vez no início do século XX por Sir Archibald Garrod durante estudos realizados em pacientes acometidos pela alcaptonúria, os quais excretam grandes quantidades de ácido homogentísico na urina devido à deficiência de uma enzima que participa do metabolismo da fenilalanina e tirosina. Ao observar que um ou mais indivíduos de uma mesma família eram frequentemente afetados pela doença, e a maior incidência de consanguinidade entre os pais dos pacientes, Garrod propôs que a alcaptonúria e outros EIM seriam exemplos de variáveis metabólicas determinadas pela hereditariedade. Através da verificação de altas quantidades de ácido homogentísico na urina dos pacientes com alcaptonúria, somado ao fato de esse ácido ser um metabólito natural da via de degradação da tirosina, Garrod relacionou esse acúmulo a um bloqueio na conversão do ácido a fumarato e acetoacetato devido à deficiência da enzima ácido homogentísico oxidase (Scriver et al., 2001; Eugene Knox, 1958).

Até o momento, mais de 600 EIM foram identificados, que podem ser classificados em quatro grandes grupos de acordo com o tipo de função exercida pela proteína deficiente e

o tecido envolvido. Considera-se ainda aspectos clínicos, bioquímicos, patológicos e terapêuticos (Sinclair, 1982). Os tipos de patologia são separados nos seguintes grupos:

a) Doenças de transporte: envolvem proteínas transportadoras de moléculas orgânicas ou inorgânicas.

b) Doenças de armazenamento, degradação e secreção: envolvem proteínas relacionadas com o aparelho de Golgi ou lisossomos, levando ao acúmulo de macromoléculas em tecidos específicos.

c) Doenças de síntese: envolvem a síntese de proteínas com funções hormonais, de defesa imunológica estrutural, entre outras.

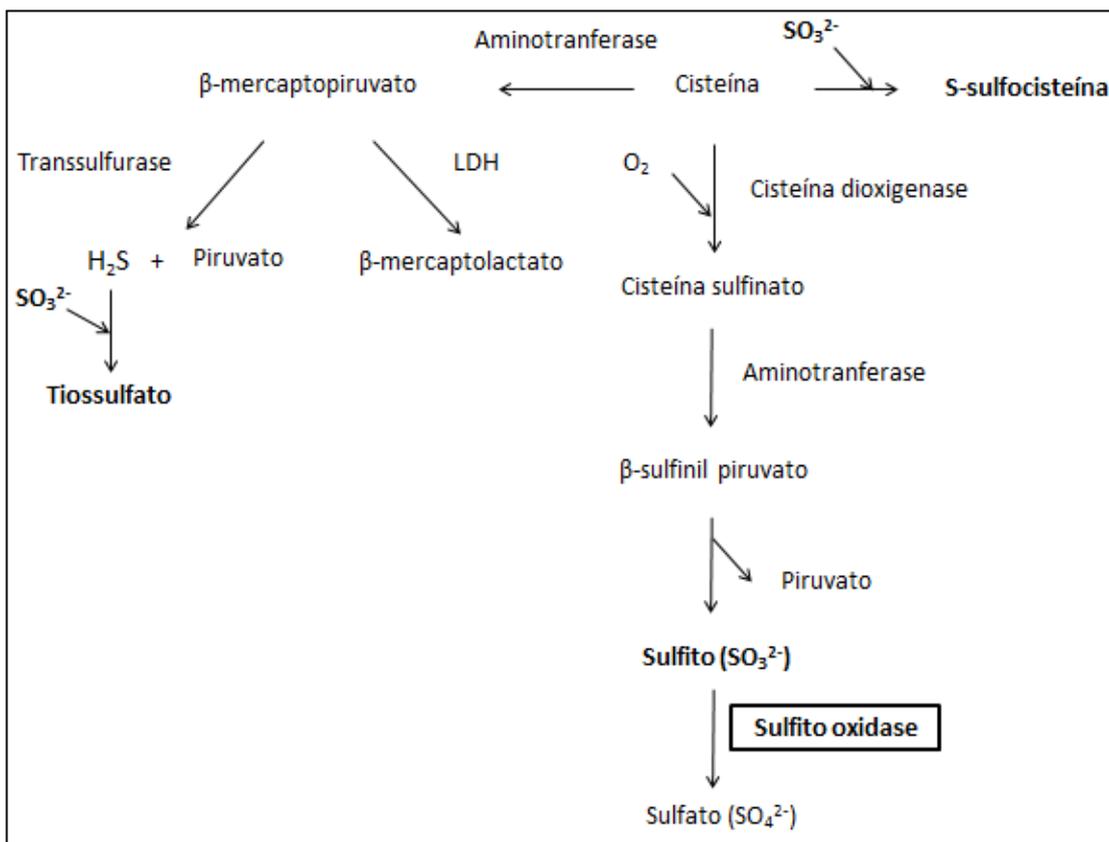
d) Doenças do metabolismo intermediário: envolvem a deficiência de enzimas relacionadas às rotas do metabolismo intermediário de moléculas pequenas, comprometendo-as, como o ciclo do ácido cítrico e ciclo da ureia. Dessa forma, o substrato se acumula e, sem que haja uma rota alternativa de metabolização, o produto final da reação não será formado. Os mecanismos de dano podem ocorrer por ação do substrato acumulado ou por seus derivados que, quando tóxicos, levam a alterações bioquímicas e danos em determinados tecidos, uma vez que são liberados na circulação e então transportados para todo o organismo, bem como pela falta de substâncias essenciais ao adequado desenvolvimento do organismo.

A adequada identificação de um EIM permite, muitas vezes, a introdução de um tratamento efetivo. Quando isso é possível, a ocorrência de outros afetados no mesmo grupo familiar pode ser evitada pela identificação de casais de risco, a quem pode ser oferecido o aconselhamento genético, ou ainda, pelo diagnóstico pré-natal (Scriver et al., 2001).

## 1.2. Sulfito oxidase (SO)

A enzima mitocondrial sulfito oxidase (SO) (EC 1.8.3.1), localizada no espaço intermembranas, catalisa a oxidação de sulfito a sulfato, a última etapa na via de degradação dos aminoácidos sulfurados metionina e cisteína (Figura 1) (Johnson, 2003; Hobson et al., 2005). Outra função dessa enzima é a detoxificação do sulfito de origem exógena, uma vez que esse composto e seus derivados são amplamente utilizados na indústria farmacêutica a fim de manter a estabilidade de certos medicamentos, assim como em conservantes alimentares (Garret et al., 1996). A enzima possui a estrutura de um heterodímero com massa molecular de aproximadamente 110 kDa, sendo que cada monômero possui três domínios: heme citocromo  $b_5$ , um domínio de ligação do cofator molibdênio e um domínio C-terminal, sendo esse responsável por sua dimerização (Kisker et al., 1997).

O cofator molibdênio (MoCo) consiste em um grupo prostético de baixo peso molecular, em que um átomo de molibdênio encontra-se complexado a uma pterina. É necessário não apenas para a atividade da enzima SO, mas também para a atividade de outras enzimas, como a xantina desidrogenase e a aldeído oxidase (Sass et al., 2010; Davis et al., 2013). O molibdênio é responsável pela oxidação do sulfito, que ocorre através da redução do molibdênio (VI) para o molibdênio (IV). Os elétrons provenientes do sulfito são então transferidos, um de cada vez, através do heme  $b_5$  da enzima para o citocromo  $c$  (Johnson e Duran, 2001). A ação da SO é responsável por manter os níveis plasmáticos de sulfito em até 10  $\mu\text{M}$  (Ji et al., 1995).

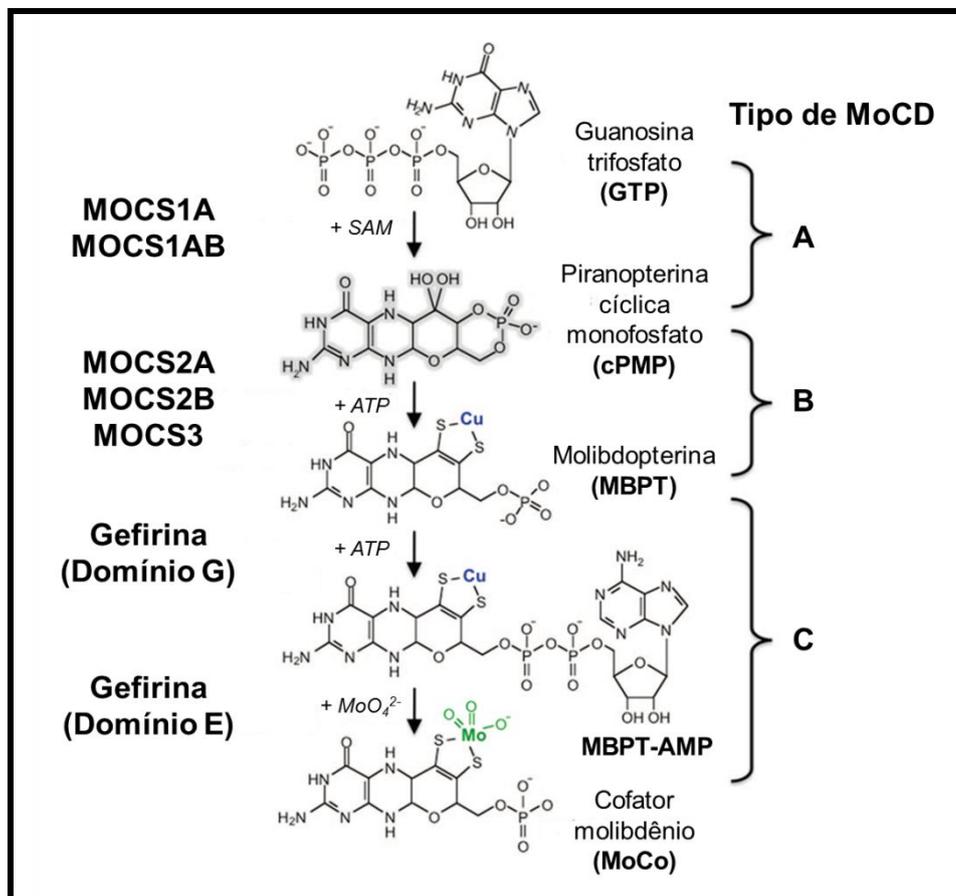


**Figura 1.** Via do catabolismo da cisteína (Adaptado de Johnson e Duran, 2001).

### 1.3. Deficiência da sulfito oxidase (SO)

A deficiência da SO é uma doença de caráter autossômico recessivo, podendo se manifestar sob duas formas. A primeira é causada pela deficiência isolada da enzima SO, enquanto a segunda pela deficiência na rota de biossíntese do MoCo. A deficiência isolada da SO ocorre devido a mutações no gene *SUOX*, responsável por codificar a proteína, o que leva a uma síntese de uma proteína defeituosa com pouco ou nenhuma atividade enzimática, sendo posteriormente degradada. Já a deficiência do MoCo é decorrente de mutações nos genes *MOCS1*, *MOCS2*, *MOCS3* ou *GEPH*, que codificam enzimas envolvidas na biossíntese da molécula molibdopterina (Figura 2). A deficiência do MoCo prejudica não apenas a atividade da SO, mas também das molibdoenzimas xantina desidrogenase e aldeído oxidase, já que

essas enzimas também necessitam do MoCo como cofator (Edwards et al., 1999; Tan et al., 2005; Sass et al., 2010).



**Figura 2.** Rota de biossíntese do cofator molibdênio (MoCo) (Adaptado de Veldman et al., 2010).

### 1.3.1. Sintomas e neuropatologia

A deficiência isolada da SO e a deficiência do MoCo apresentam sintomas e achados neuropatológicos similares. Ambas as formas são clinicamente caracterizadas por disfunção neurológica grave e progressiva, convulsões neonatais, hipotonia axial, hipertonicidade periférica, além de subluxação do cristalino e atraso no desenvolvimento, resultando geralmente em morte prematura (Chan et al., 2002; Edwards et al., 1999; Johnson e Duran,

2001). Os achados neuropatológicos incluem encefalopatia grave com perda massiva de neurônios e desmielinização na substância branca cerebral acompanhada de gliose e espongirose difusa. Atrofia cortical grave, dilatação dos ventrículos e anormalidades nos gânglios basais, bem como perda de mielina no cerebelo também já foram evidenciados (Chen et al., 2014; Edwards et al., 2015; Tan et al., 2005; Vijayakumar et al., 2011). Além disso, exames de ressonância magnética mostram hipoplasia do corpo caloso, gânglios basais e tronco cerebral, e alterações císticas e calcificações nos gânglios basais (Bindu et al., 2011; Holder et al., 2014; Tan et al., 2005).

### ***1.3.2. Tratamento***

O tratamento para ambas as formas da deficiência da SO é bastante limitado. O tratamento sintomático é geralmente realizado com o objetivo de controlar as convulsões, porém apresenta pouco sucesso (Sass et al., 2010). Em alguns pacientes com deficiência moderada da atividade da SO, uma dieta com baixa quantidade de proteína e teor reduzido de aminoácidos sulfurados também é utilizada, causando diminuição dos níveis de tiosulfato e S-sulfocisteína na urina e progresso no desenvolvimento psicomotor (Touati et al., 2000). Um novo tratamento para pacientes com a deficiência do MoCo causada por mutações no gene *MOCSI* foi proposto por Veldman et al. (2010), consistindo na terapia de substituição com piranopterina monofosfato cíclica (cPMP), um intermediário da via biossintética do MoCO (Figura 2), através de administração intravenosa. Os biomarcadores urinários da doença (S-sulfocisteína, xantina e urato) retornaram a níveis quase normais em todos os pacientes tratados com cPMP, e grande parte dos pacientes apresentou uma melhora clínica, com total supressão ou redução das convulsões (Schwahn et al., 2015). No entanto, esse tratamento não é eficiente para pacientes com a deficiência isolada da SO, que apresentam síntese normal de

MoCo, e nem para pacientes com outros tipos de deficiência do MoCo, uma vez que esses apresentam um bloqueio enzimático na via de biossíntese do MoCo posterior à síntese de cPMP. Portanto, é importante o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas que sejam benéficas para todos os fenótipos da deficiência da SO.

### ***1.3.3. Fisiopatologia***

Apesar de os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na disfunção neurológica na deficiência da SO não estarem totalmente estabelecidos, estudos mostram que o sulfito é um metabólito neurotóxico. Já foi demonstrado que o sulfito pode sofrer auto-oxidação gerando radicais livres (Abedinzadeh, 2001; Baker et al., 2002; Hayon et al., 1972), e induzir estresse oxidativo *in vitro* em cérebro e hepatócitos de ratos (Derin et al., 2009; Grings et al., 2013). Em estudos com ratos deficientes para a SO, foi verificado que concentrações aumentadas de sulfito induzem lipoperoxidação no hipocampo e diminuem a capacidade antioxidante do plasma, além de causarem déficit cognitivo (Herken et al., 2009; Kucukatay et al., 2006). Zhang e colaboradores (2004) observaram que o sulfito diminui a biossíntese de ATP e o potencial de membrana mitocondrial, e inibe a atividade da glutamato desidrogenase em mitocôndrias cerebrais de ratos. Além disso, estudos *in vitro* de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o sulfito altera o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória e diminui o consumo de oxigênio em cérebro de ratos normais (Grings et al., 2014; de Moura Alvorcem et al., 2017). O sulfito também induz a abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial na presença de  $Ca^{2+}$ , resultando na liberação de citocromo *c* da mitocôndria (Grings et al., 2014), inibe a atividade da creatina cinase e causa morte neuronal (de Moura Alvorcem et al., 2017; Kumar et al., 2017; Parmeggiani et al., 2015). Recentemente, nosso grupo evidenciou que a administração intraestriatal de sulfito induz estresse oxidativo, causa

disfunção mitocondrial, reatividade glial e morte neuronal em estriado de ratos (Grings et al., 2017). Esses efeitos tóxicos causados pelo sulfito foram prevenidos pela administração de bezafibrato (BEZ) (Grings et al., 2017), um composto potencialmente neuroprotetor por ter a capacidade de induzir biogênese mitocondrial.

## **1.2. Mielina**

A mielina é uma estrutura formada por uma membrana lipídica rica em glicofosfolipídeos e colesterol que recobre os axônios facilitando a rápida comunicação entre os neurônios e assim elevando a velocidade dos potenciais de ação neuronais (Nave, 2010). O aumento dessa velocidade se deve ao fato de a mielina reduzir a capacitância e elevar a resistência transversal ao longo do eixo da membrana axonal dos neurônios, juntamente com o fato de agrupar os canais de sódio entre os nódulos da mielina, elevando a velocidade da neurotransmissão saltatória (Hartline e Colman, 2007). As células gliais responsáveis pela mielinização dos axônios neuronais a fim de isolá-los no sistema nervoso central (SNC) são os oligodendrócitos (Nave, 2010).

Os oligodendrócitos também fornecem fatores tróficos para os axônios, lactato como combustível energético e têm papel fundamental na manutenção da integridade axonal (Lee et al., 2012; Saab et al., 2016; Dulamea, 2017).

A formação da mielina em mamíferos é descrita como um processo pós-natal que prossegue durante o curso inicial do desenvolvimento. No SNC, esse processo se caracteriza pela emergência e expansão pré-natal tardia e também pós-natal de células precursoras de oligodendrócitos (CPOs) e sua subsequente diferenciação em oligodendrócitos maduros. Recentemente, foi evidenciado que as CPOs se proliferam inclusive no SNC de adultos (Kessaris et al., 2006; Lu et al., 2002; Hughes et al., 2013; Young et al., 2013), sendo que as

taxas de proliferação e maturação variam com a idade e a região. No caso de roedores, estima-se que de 5% a 20% da população total de oligodendrócitos sejam gerados apenas a partir do dia pós-natal 45 (Kang et al., 2010; Rivers et al., 2008; Young et al., 2013).

A mielinização é finamente regulada por sinalizações oligodendrócito-neurônio e depende do estágio de desenvolvimento. Alguns fatores neuronais que controlam a função do oligodendrócito já foram identificados, tais como a neuroregulina-1 (Brinkmann et al., 2008; Wang et al., 1998; Charles et al., 2000; Jakovcevski e Zecevic, 2007, Fewou et al., 2007; Laursen et al., 2009; Mi et al., 2005). Além disso, como mencionado acima, estudos indicam que a interação mútua entre oligodendrócitos e neurônios controlam não apenas a mielinização mas também a maturação dos axônios neuronais. Nesse contexto, foi demonstrado que a ativação da via neuronal  $PIP_3$ -Akt1-mTOR é capaz de iniciar o processo de crescimento axonal, levando ao recrutamento de CPOs e a indução da mielinização progressiva do SNC (Lee et al., 2012; Colello et al., 1994; Goebbels et al., 2017). Durante a mielinização, os oligodendrócitos envolvem sua membrana plasmática uma série de vezes em torno do axônio selecionado em um processo que requer síntese de membrana e compactação coordenados. Em todas as etapas do processo, desde o reconhecimento do axônio até a compactação final e manutenção da mielina, proteínas específicas desempenham um papel central (Han et al., 2013).

Dentre as proteínas presentes na mielina do SNC, uma das mais abundantes é a proteína básica da mielina (MBP). A MBP é responsável por manter a adesão das faces citoplasmáticas da membrana celular da mielina compactada (Lutton et al., 2004; Moscarello et al., 1994; Tzakos et al., 2005). Possui diversas isoformas, sendo a mais comum em adultos a de 18,5 kDa (Harauz e Libich, 2009). A MBP contém uma alta proporção de aminoácidos polares e positivamente carregados e, sendo uma proteína periférica de membrana, pode se ligar a outras membranas lipídicas e proteínas (Krigbaum e Hsu, 1975; Smith, 1977; Beniac et

al., 1997). Um dos ligantes mais bem caracterizados da MBP é a calmodulina, conhecida como “sensor” de cálcio. A calmodulina, quando ativada por cálcio, interage com a MBP e regula a sua associação com proteínas do citoesqueleto e da membrana lipídica, estabilizando a estrutura da mielina (Wang et al., 2011; Musse et al. 2008; Harauz e Libich, 2009).

Insultos que resultam em desmielinização, tais como lesões na coluna vertebral (Adieli e Adieli, 2017), são acompanhados de remielinização. Apesar de a reposição neuronal ser relativamente limitada, o processo de remielinização permanece rápido e eficiente durante a idade adulta (Levine et al. 2001; Franklin, 2002). Essa capacidade se deve à presença de um número considerável de CPOs, que se diferenciam em oligodendrócitos maduros a fim de regenerar a mielina quando necessário. As CPOs expressam grande quantidade do proteoglicano neuroglicano-2 (NG2), sendo esse considerado um marcador dessas células (Polito e Reynolds, 2005). O NG2 possui o glicosaminoglicano condroitina sulfato em sua estrutura e tem importante papel na proliferação e motilidade de diferentes células, incluindo as CPOs, além de atuar em cooperação com o PDGFR $\alpha$ , o receptor responsável por mediar a resposta das CPOs ao fator de crescimento PDGF (Kucharova e Stallcup, 2010).

Alterações e perda da mielina têm sido relatado em diferentes doenças, que são geralmente causadas por danos em proteínas específicas da mielina. Essas doenças são de origem autoimune ou geneticamente herdadas, podendo afetar tanto o SNC quanto o sistema nervoso periférico (Han et al., 2013). Dentre essas patologias, a esclerose múltipla é a doença autoimune desmielinizante do SNC mais comum e para a qual os tratamentos disponíveis têm eficácia limitada. Outras doenças com perda de mielina incluem neuropatias periféricas, e as doenças de Charcot-Marie-Tooth e de Dejerine-Sottas (Han et al., 2013).

### 1.3. Inflamação

A inflamação é uma resposta de defesa do organismo contra um estímulo que induz dano. No SNC, a defesa imunológica caracteriza-se por ser dinâmica, específica e altamente regulada, envolvendo diversas rotas/cascatas de sinalização durante a progressão da doença ou de algum dano. Um quadro de inflamação no SNC é comumente chamado de neuroinflamação e é caracterizado pela ativação de células gliais, principalmente micróglia e astrócitos (Ramos et al., 2017). A micróglia é conhecida como os macrófagos residentes do SNC e representa a primeira linha de defesa contra patógenos (Tay et al., 2017; Hamby et al., 2012; Hotamisligil, 2006; Kotas & Medzhitov, 2015). Quando ativada, a micróglia passa por diversas alterações na morfologia, tamanho, número e, a nível molecular, no perfil de moléculas expressas na sua superfície, bem como nas citocinas e fatores de crescimento produzidos. Dentre essas moléculas, destaca-se o aumento na expressão da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), sendo essa considerada um marcador de ativação microglial. A partir dessas alterações, a micróglia então é capaz de fagocitar "restos" biológicos, incluindo corpos apoptóticos, e uma variedade de patógenos e partículas exógenas através de vias de fagocitose bem estabelecidas (Streit et al., 1999; Chan et al., 2001; Fu et al., 2014).

A resposta inflamatória no SNC geralmente tem início com o recrutamento e ativação da micróglia local em resposta a fatores de sinalização liberados pelo tecido neuronal (Hines et al., 2009; Kreutzberg, 1996). Tais fatores incluem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados a danos (DAMPs) que ativam receptores de reconhecimento de padrão, como os receptores do tipo Toll, induzindo uma resposta a insultos e dano físico (Janeway, 1992; Kigerl et al., 2014). Os PAMPs são expressos por microorganismos e têm papel essencial na imunidade inata. Já os DAMPs são

produzidos por células com algum tipo de dano. Os receptores do tipo Toll quando ativados, promovem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias via ativação de diferentes vias, como as vias das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a via do fator nuclear kappa B (NFkB) (Akira and Takeda, 2004).

O NFkB é um importante fator de transcrição altamente complexo que pode ser ativado por diferentes estímulos durante processos inflamatórios, tais como citocinas inflamatórias, radicais livres, estresse, entre outros. Apresenta cinco subunidades (p50, p52, RelA, RelB, c-Rel), uma família de inibidores (IkbBs), e complexos cinases ativadores *upstream* (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  and IKK $\gamma$ /NEMO) (Oeckinghaus e Ghosh, 2009). Geralmente, o NFkB encontra-se no citosol na forma de um hetero ou homodímero sequestrado por um tipo de IkbB. Na presença de um estímulo, o IkbB é fosforilado por uma cinase *upstream* e degradado, assim liberando o dímero ativo de NFkB para o núcleo onde regula a transcrição de diferentes genes, tais como os das citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e o da óxido nítrico sintase (Gerondakis et al., 2014).

Nesse contexto, estudos da literatura têm demonstrado neuroinflamação em diferentes doenças e condições patológicas, tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e isquemia (Smith et al., 2012). Tem sido evidenciado que o processo neuroinflamatório nessas doenças é caracterizado por aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e na produção de espécies reativas, bem como a ativação do NFkB que pode levar até mesmo à morte celular em algumas condições (Smith et al., 2012).

#### **1.4. Bezafibrato (BEZ)**

O BEZ é um agonista de receptores PPARs (receptores ativados por proliferadores de peroxissomos) comumente usado para o tratamento de hiperlipidemias, pois ativa a expressão da enzima carnitina palmitoil transferase II e, portanto, modula a oxidação de ácidos graxos, principalmente quando usado em conjunto com a suplementação de L-carnitina (Noe et al., 2013). O BEZ modula diferentes vias de sinalização, sendo uma das principais vias influenciadas a do eixo PPAR-PGC-1 $\alpha$  (co-ativador de PPARs) (Johri e Beal, 2012). O PGC-1 $\alpha$  (co-ativador 1 $\alpha$  do receptor ativado por proliferador do peroxissomo), ao ser ativado pelo PPAR, induz biogênese mitocondrial através da expressão dos genes para o fator nuclear respiratório (NRF1) e fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), e também aumenta a expressão de diversas enzimas antioxidantes (Johri e Beal, 2012; Noe et al., 2013). Devido a essas ações do BEZ, estudos têm avaliado esse composto como um agente protetor em modelos animais para diferentes doenças neurodegenerativas, tais como as doenças de Parkinson e Huntington, e também para alguns EIM como a adrenoleucodistrofia ligada ao X (Engelen et al., 2012; Johri e Beal, 2012; Johri et al., 2012).

## **1.2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos da administração intraestriatal de sulfito sobre parâmetros de estrutura da mielina e de inflamação em estriado de ratos jovens, no intuito de verificar alterações bioquímicas que possam contribuir para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo dano cerebral apresentado pelos pacientes

acometidos pela deficiência da SO. Também foi avaliada a influência da administração de BEZ sobre os possíveis efeitos tóxicos do sulfito a fim de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para essa doença.

## **2.2. Objetivos específicos**

- Estudar os efeitos da administração intraestriatal de de sulfito sobre a marcação da Fluoromielina, MBP e NG2 em estriado de ratos jovens 7 dias após a injeção.
- Estudar os efeitos da administração intraestriatal de de sulfito sobre a marcação de molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1), e os níveis do RNAm das citocinas TNF e IL-1 $\beta$ , e do fator de transcrição NF $\kappa$ B em estriado de ratos 7 dias após a injeção.
- Estudar a influência da administração por gavagem de BEZ (30 ou 100 mg/kg/dia) sobre os efeitos da administração de de sulfito na marcação da Fluoromielina, MBP, NG2 e Iba1 em estriado de ratos 7 dias após a injeção de sulfito.

## **I.3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. Animais**

Foram utilizados ratos Wistar machos de 23 e 30 dias de vida obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. Os animais foram mantidos em um ciclo claro/escuro 12:12 h (luzes das 07:00 às 19:00) em temperatura monitorada constante de  $22 \pm 1$  °C, com livre acesso à água e ração comercial com 20 % de proteína (Nuvilab CR-1®, Colombo, PR, Brasil). O protocolo experimental foi aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, de acordo com as diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008, bem como o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do *Canadian Council on Animal Care* (CCAC). Todos os esforços para minimizar o número de animais utilizados, bem como seu sofrimento, desconforto e estresse foram realizados.

### **3.2. Administração intraestriatal de sulfito**

No 30º dia de vida, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e posicionados em aparelho estereotáxico. Duas perfurações foram realizadas no crânio e 2 µl de sulfito 1 M (2µmol) ou de NaCl 1 M (2µmol) foram lentamente injetados bilateralmente no estriado durante 4 min através de uma agulha conectada à uma seringa Hamilton de 10 µl por um tubo de polietileno. Após a injeção, a agulha foi deixada no local por 1 min e então cuidadosamente removida. As soluções para injeção foram em preparadas em água e o pH foi ajustado para 7,4. As coordenadas para a injeção de sulfito foram as seguintes: 0,6 mm posterior ao bregma, 2,6 mm lateral à linha medial e 4,5 mm ventral à dura, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1986). Os animais foram eutanasiados 7 dias após a injeção de sulfito ou NaCl.

### **3.3. Tratamento com bezafibrato (BEZ)**

Ratos Wistar de vinte e três ou trinta dias foram divididos em 3 grupos: veículo + NaCl (controle), veículo + sulfito (sulfito), bezafibrato + sulfito (BEZ30 e BEZ100). O BEZ

(30 mg/kg/dia ou 100 mg/kg/dia) foi administrado nos grupos BEZ30 e BEZ100, respectivamente, por gavagem durante 7 dias utilizando óleo de milho como veículo (Knapik-Czajka, 2013; Nakajima et al., 2009). Os grupos controle e sulfito receberam apenas veículo. A gavagem foi realizada uma vez ao dia, entre 11:00 e 13:00, através da colocação de uma agulha de gavagem com tamanho adequado, a qual é introduzida via oral até alcançar o estômago do animal. Os ratos que receberam o pré-tratamento com BEZ receberam o composto do 23º ao 30º dia de vida, sendo a última administração 1 h antes da injeção de sulfito. Já no pós-tratamento, o BEZ foi administrado do 30º ao 37º dia de vida, uma vez ao dia, sendo a primeira administração feita 01h após a injeção de sulfito, e a última administração realizada 6 h antes da eutanásia. As doses de bezafibrato (30 ou 100 mg/kg/dia) foram escolhidas de acordo com Grings et al. (2017). Nesse estudo, foi verificado que essas doses não causam alterações per se sobre parâmetros de dano celular.

### **3.4. Imunohistoquímica e marcação com Fluoromielina**

No dia da eutanásia, os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os animais foram então perfundidos com uma solução de citrato de sódio 0,2 % preparada em salina 0,9 % e, a seguir, com uma solução de paraformaldeído 4 % preparada em tampão PBS 0,1 M, pH 7,4, para a fixação cerebral. Os cérebros foram então removidos, pós-fixados por imersão em paraformaldeído durante no mínimo 24 h, e ali mantidos até a preparação das fatias. Séries consecutivas de fatias de 30 µm de seções coronais contendo o estriado foram obtidas com a utilização de um vibrátomo Leica 1000S (Nussloch, Alemanha) e armazenadas em PBS 0,1 M à temperatura de 4°C. Para cada animal e cada marcação, de 3 a 6 fatias foram utilizadas (Moura, 2017).

As fatias foram lavadas com PBS e submetidas à fervura em uma solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, para a exposição dos antígenos. As fatias foram então permeabilizadas com PBS contendo Triton X-100 0,3 % (PBST) por 20 min e bloqueadas por 60 min com uma solução de PBST contendo albumina sérica bovina 5 %. Em seguida, as fatias foram incubadas a 4°C por 48 h com os anticorpos anti-MBP (1:400, Abcam, Cambridge, MA), anti-Iba1 (1:1000, Wako Pure Chemical Industries, Japan), e anti-NG2 (1:200, Abcam, Cambridge, MA), diluídos em PBST. Após a incubação, elas foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpos Alexa Fluor® 488 anti-*rat* IgG ou Alexa Fluor® 546 anti-*rabbit* IgG conjugados com sondas fluorescentes (1:500, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) por 2 h à temperatura ambiente. As fatias foram lavadas novamente com PBS, montadas em lâminas de vidro com o meio de montagem Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e visualizadas em um microscópio confocal FV300 Olympus (Tóquio, Japão) contendo lasers de 488 e 546 nm.

Além disso, 3 a 5 fatias foram incubadas à temperatura ambiente com 300 µl de uma solução estoque de Fluoromielina (1:300) durante 20 min. As fatias foram lavadas, montadas em lâminas com Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e visualizadas em um microscópio confocal FV300 Olympus (Tóquio, Japão) contendo lasers de 488 e 546 nm. Para todos os tratamentos, 5 áreas de cada fatia foram aleatoriamente selecionadas e fotografadas. A intensidade da fluorescência foi avaliada com a utilização do software ImageJ (Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos em porcentagem do controle.

### **3.5. RT-PCR Quantitativo**

Após os tratamentos, o RNA total do tecido foi isolado usando TRIzol Reagent e transcrito reversamente para a obtenção do DNA complementar (cDNA) utilizando-se um kit comercial

da Applied Biosystems (High-Capacity complementary DNA Reverse Transcription Kit; Foster City, CA, EUA). A quantificação do RNA mensageiro (RNAm) dos genes de interesse foi realizada usando o sistema TaqMan de PCR em tempo real (NFkB: *Rn01399572\_m1*; IL-1 $\beta$ : *Rn00580432\_m1*; TNF: *Rn99999017\_m1*), com primers e sondas adquiridas da Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Os níveis dos RNAm-alvos foram normalizados pelos níveis de  $\beta$ -actina usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **3.6 Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados foram analisados por teste de Student para amostras não pareadas ou por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de raios múltiplos de Duncan, quando o valor de  $F$  foi significativo, usando o programa SPSS versão 16. As análises foram consideradas significativas quando o  $P < 0,05$ .

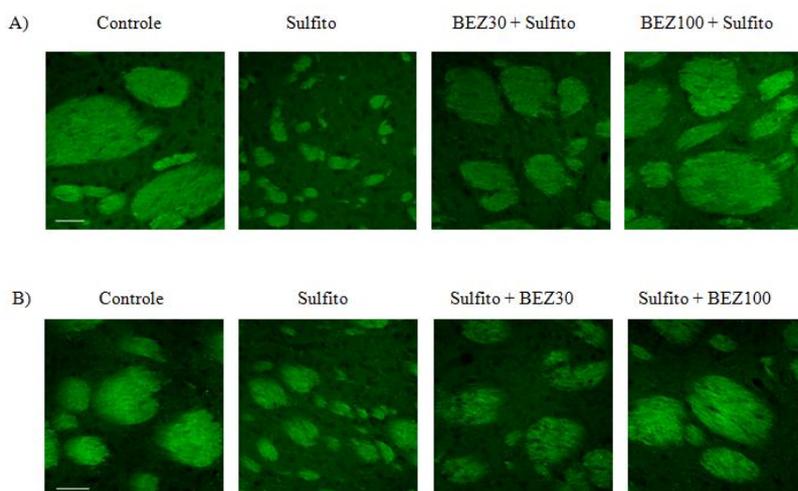
## **PARTE II**

## **II.1. RESULTADOS**

Inicialmente, estudamos os efeitos da administração intraestriatal de sulfito (2  $\mu$ mol) associada ou não à administração por gavagem de BEZ (30 ou 100 mg/kg/dia) sobre a marcação da Fluoromielina, MBP e NG2, parâmetros de estrutura e compactação da mielina, em estriado de ratos.

### **1.1. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da Fluoromielina em estriado de ratos jovens**

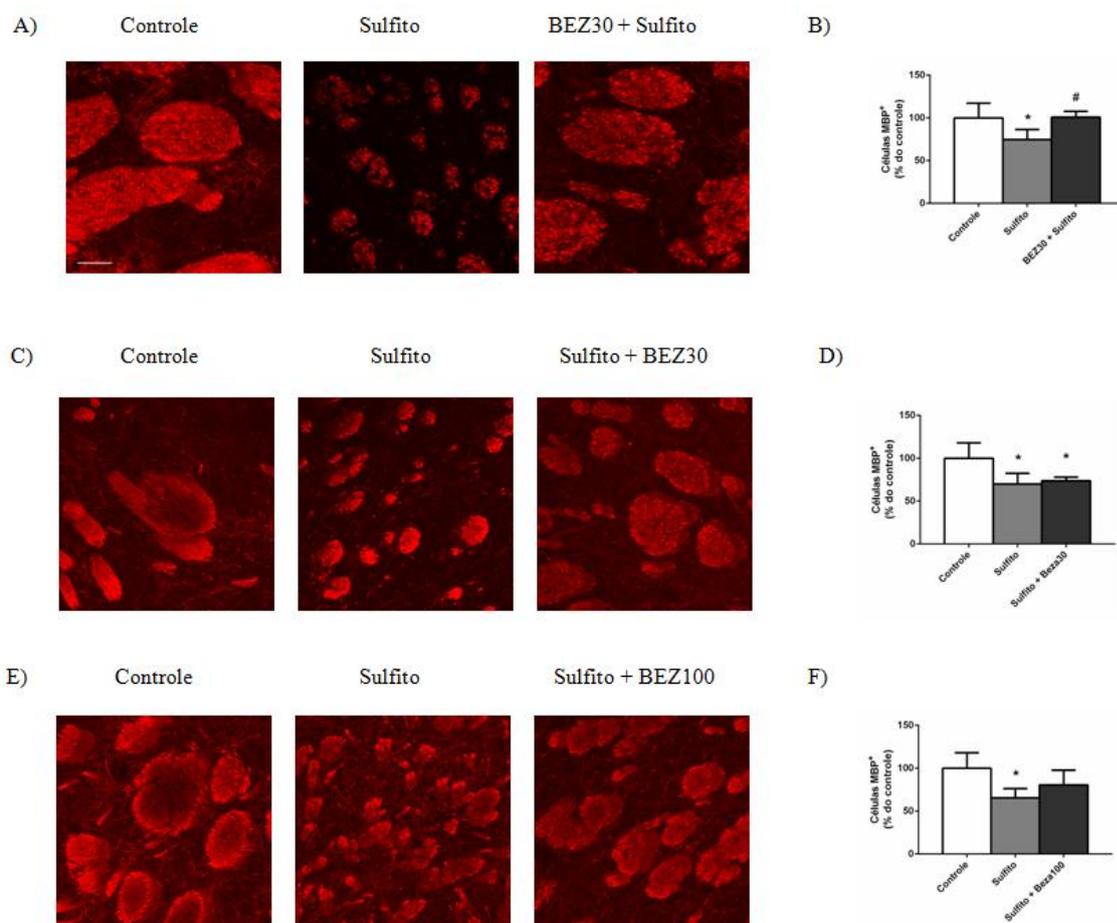
Nossos resultados mostram que a injeção de sulfito diminuiu os feixes de axônios em estriado de ratos eutanasiados 7 dias após a injeção, como observado através da marcação da Fluoromielina (Figuras 3A e B), uma sonda com alta sensibilidade que marca áreas mielinizadas (Oliveira-Bravo, 2014). Além disso, observamos que o BEZ (30 e 100 mg/kg/dia), quando administrado anteriormente (pré-tratamento com BEZ) (Figura 3A) e posteriormente (pós-tratamento com BEZ) (Figura 3B) à injeção de sulfito, preveniu as alterações observadas na marcação da Fluoromielina induzidas pelo sulfito.



**Figura 3.** Efeitos do pré- (A) e pós-tratamento (B) com bezafibrato (BEZ; 30 ou 100 mg/kg/dia) sobre as alterações causadas pela administração de sulfito (2  $\mu$ mol) na marcação da Fluoromielina em estriado de ratos. Barra de calibração indica 50  $\mu$ m. O pré-tratamento com BEZ foi realizado por gavagem durante 7 dias antes da administração de sulfito, ao passo que o pós-tratamento foi feito durante 7 dias após a administração. Estão mostradas imagens representativas da marcação da Fluoromielina no estriado dos animais.

## **1.2. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da MBP em estriado de ratos jovens**

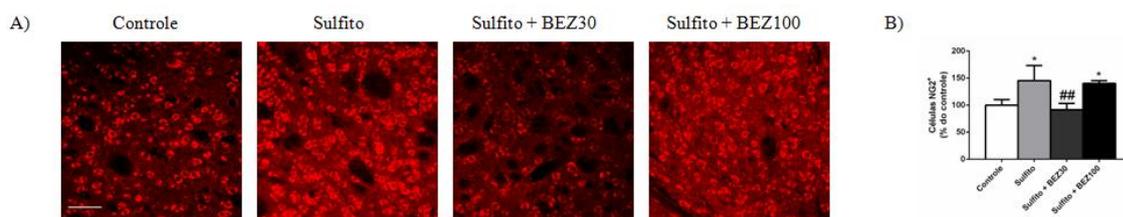
A seguir, foi avaliada a marcação da MBP, outro parâmetro de estrutura de mielina, 7 dias após a injeção de sulfito e foi verificado que esse metabólito diminuiu significativamente a intensidade da fluorescência dessa marcação, bem como o volume dos feixes de axônios em estriado de ratos (Figuras 4A, 4C e 4E). Com relação à administração de BEZ, o pré-tratamento com 30 mg/kg/dia desse composto preveniu tanto a diminuição na marcação da MBP quanto a redução do volume dos feixes de axônios causadas pelo sulfito (Figura 4A). A prevenção das alterações observadas na marcação da MBP provocadas pelo sulfito ainda foi observada com o pós-tratamento com 100 mg/kg/dia de BEZ (Figuras 4C e 4D). Já o pós-tratamento com 30 mg/kg/dia de BEZ preveniu apenas a diminuição do volume dos axônios, mas não a intensidade da marcação da MBP (Figuras 4E e 4F).



**Figura 4.** Efeitos do pré- (A e B) e pós-tratamento (C-F) com bezafibrato (BEZ; 30 ou 100 mg/kg/dia) sobre as alterações causadas pela administração de sulfito (2  $\mu$ mol) na marcação da proteína básica da mielina (MBP) em estriado de ratos. O pré-tratamento com BEZ foi realizado por gavagem durante 7 dias antes da administração de sulfito, ao passo que o pós-tratamento foi feito durante 7 dias após a administração. (A, C e E) Estão mostradas imagens representativas da marcação da MBP no estriado dos animais. Barra de calibração indica 50  $\mu$ m. (B, D e F) Quantificação da marcação da MBP. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio-padrão para três a seis experimentos independentes (animais) por grupo. \*P<0,05, comparado ao grupo controle; #P<0,05, comparado ao grupo sulfite (ANOVA seguido do teste de Duncan).

### 1.3. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação de NG2 em estriado de ratos jovens

Também foi avaliado o efeito do sulfito sobre a marcação do NG2, proteína expressa pelas CPOs, 7 dias após a injeção. A Figura 5 demonstra que o sulfito aumentou a marcação dessa proteína, bem como a densidade de células expressando NG2 (Figuras 5A e 5B). Também verificamos que o pós-tratamento com 30 mg/kg/dia de BEZ preveniu as alterações na marcação do NG2 (Figura 5B), enquanto o pós-tratamento com 100 mg/kg/dia desse composto não apresentou efeito protetor (Figura 5B).

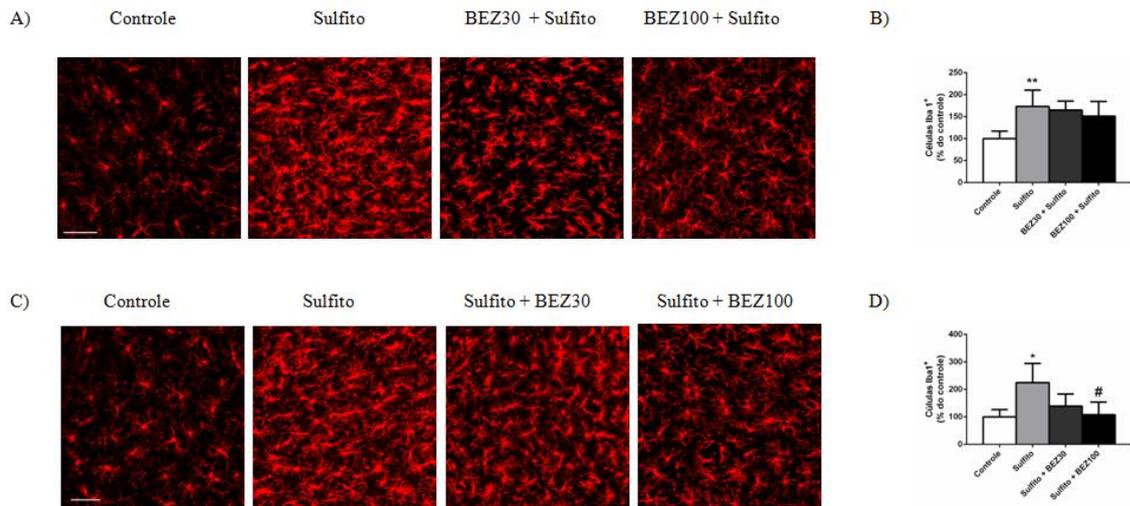


**Figura 5.** Efeito do pós-tratamento (A) com bezafibrato (BEZ; 30 ou 100 mg/kg/dia) sobre as alterações causadas pela administração de sulfito (2  $\mu$ mol) na marcação do neuroglicano-2 (NG2) em estriado de ratos. O pós-tratamento com BEZ foi realizado por gavagem durante 7 dias após da administração de sulfito. (A) Estão mostradas imagens representativas da marcação do NG2 no estriado dos animais. Barra de calibração indica 50  $\mu$ m. (B) Quantificação da marcação do NG2. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio-padrão para três a seis experimentos independentes (animais) por grupo. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle; ## $P < 0,01$ , comparado ao grupo sulfito (ANOVA seguido do teste de Duncan).

O próximo passo de nossa investigação consistiu em estudar os efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração de BEZ sobre marcadores de processo inflamatório, tais como marcação de Iba1, e os níveis do RNAm das citocinas TNF e IL-1 $\beta$ , além do fator de transcrição NF $\kappa$ B em estriado de ratos.

#### **1.4. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito associada ou não à administração por gavagem de BEZ sobre a marcação da Iba1 em estriado de ratos jovens**

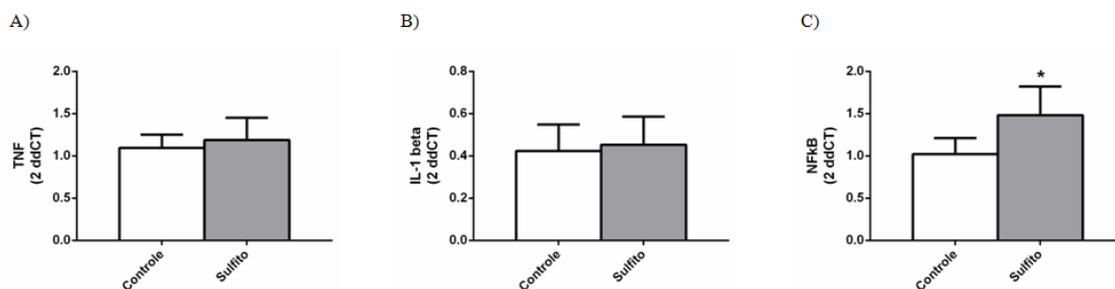
Estudamos o efeito do sulfito sobre a marcação de Iba1, uma proteína expressa em grandes quantidades pela micróglia, 7 dias após a injeção. Pode ser observado na Figura 6 que o sulfito aumentou significativamente a fluorescência da marcação da Iba1 e a densidade de células marcadas com essa proteína, indicando que esse metabólito causa ativação microglial e inflamação. O pré-tratamento com BEZ (30 e 100 mg/kg/dia) não foi capaz de atenuar ou prevenir estatisticamente o efeito do sulfito (Figura 6B). Por outro lado, o pós-tratamento com BEZ, na dose de 30 mg/kg/dia, atenuou as alterações na marcação de Iba1, ao passo que na dose de 100 mg/kg/dia o BEZ preveniu totalmente essas alterações induzidas pela administração de sulfito (Figura 6D).



**Figura 6.** Efeitos do pré- (A) e pós-tratamento (B) com bezafibrato (BEZ; 30 ou 100 mg/kg/dia) sobre as alterações causadas pela administração de sulfito (2  $\mu$ mol) na marcação da molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (Iba1) em estriado de ratos. O pré-tratamento com BEZ foi realizado por gavagem durante 7 dias antes da administração de sulfito, ao passo que o pós-tratamento foi feito durante 7 dias após a administração. (A e C) Estão mostradas imagens representativas da marcação de Iba1 do estriado animais. Barra de calibração indica 50  $\mu$ m. (B e D) Quantificação da marcação de Iba1. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio-padrão para três a seis experimentos independentes (animais) por grupo. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , comparado ao grupo controle; # $P < 0,05$ , comparado ao grupo sulfito (ANOVA seguido do teste de Duncan).

### 1.5. Efeitos da administração intraestriatal de sulfito sobre os níveis do RNAm do TNF e da IL-1 $\beta$ , bem como do NF $\kappa$ B em estriado de ratos jovens

A Figura 7 mostra que o sulfito não alterou significativamente os níveis do RNAm das citocinas TNF e IL-1 $\beta$  em estriado de ratos eutanasiados 7 dias após a administração. Contudo, o sulfito elevou significativamente os níveis do RNAm do NF $\kappa$ B (Figura 7C), reforçando que esse metabólito induz processo inflamatório.



**Figura 7.** Efeitos da injeção de sulfito (2  $\mu$ mol) sobre os níveis de RNAm do fator de necrose tumoral (TNF) (A), da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (B) e do fator nuclear kappa B (NF $\kappa$ B) (C) em estriado de ratos. Os valores estão expressos em média  $\pm$  desvio-padrão para quatro a cinco experimentos independentes (animais) por grupo. \* $P < 0,05$ , comparado ao grupo controle (Teste *t* de Student).

## **PARTE III**

### III.1. DISCUSSÃO

A deficiência da SO é uma doença hereditária caracterizada pelo acúmulo tecidual e elevada excreção urinária predominantemente de sulfito. Dentre os sintomas mais comuns encontrados nos pacientes, observam-se convulsões neonatais graves, encefalopatia e retardo psicomotor. Os achados neuropatológicos incluem anormalidades dos gânglios basais e encefalopatia grave com perda neuronal, além de desmielinização da substância branca acompanhada de espongiose difusa e gliose (Bindu et al., 2011; Westerlinck et al., 2014, Abedinzadeh, 2001; Baker et al., 2002). Considerando que diversos estudos têm sugerido que o acúmulo de sulfito está envolvido no aparecimento e progressão dos achados clínicos e neuropatológicos (Johnson e Duran, 2010; Ozturk et al., 2010), o objetivo deste trabalho foi o de estudar os efeitos da administração intraestriatal de sulfito sobre a estrutura e compactação da mielina, e investigar se esse metabólito induz processo inflamatório em estriado de ratos jovens. Também avaliamos se o BEZ, um pan-agonista de receptores PPAR com potencial efeito neuroprotetor, poderia prevenir os efeitos tóxicos causados pelo sulfito.

Nossos resultados mostraram que o sulfito diminuiu os feixes e volume dos axônios, como observado através da Fluoromielina e da marcação da MBP. O sulfito também reduziu a intensidade da marcação da MBP. Esta proteína é um componente integral da mielina responsável pela adesão das superfícies citoplasmáticas da membrana dos oligodendrócitos umas às outras, contribuindo para a formação, desenvolvimento e estabilidade da mielina (Trapp e Kidd 2004; Harauz e Boggs, 2013). A isoforma mais comum em adultos, de 18kDa, também medeia diferentes vias de sinalização, e participa na manutenção da homeostase de cálcio e na organização do citoesqueleto celular (Harauz e Libich, 2009; Harauz e Boggs, 2013; Boggs e Rangaraj, 2000; Boggs et al., 2005, 2006, 2012; Boggs, 2006, 2011). Dessa forma, visto que os feixes dos axônios estão alterados e que a MBP está diminuída, nossos

achados indicam que a administração de sulfito causa dano à compactação e estrutura da mielina.

No presente estudo não foram estabelecidos os mecanismos pelos quais o sulfito causa dano à mielina. Contudo, em um trabalho realizado pelo nosso grupo foi verificado que o sulfito induz a abertura do poro de permeabilidade transitória mitocondrial e, assim, diminui a capacidade da mitocôndria em reter cálcio (Grings et al., 2014), levando possivelmente à elevação das concentrações citosólicas desse cátion. Visto que a calmodulina, quando ativada por cálcio, interage com a MBP e regula a sua interação com proteínas do citoesqueleto e da membrana lipídica, pode-se especular que a elevação das concentrações de cálcio no citosol induzida pelo sulfito possa desregular a interação calmodulina-MBP e causar a perda da compactação da mielina. Além disso, dados da literatura evidenciaram que o sulfito aumenta a produção de radicais livres *in vitro* e *in vivo* (Grings et al. 2014; de Moura Alvorcem et al., 2017), o que causa dano oxidativo em diferentes biomoléculas, incluindo proteínas. Dessa forma, é possível que os radicais livres gerados pelo sulfito possam causar dano oxidativo à MBP ou até mesmo a proteínas do citoesqueleto, acarretando alterações na mielina.

Também verificamos que o sulfito aumentou tanto a fluorescência como a densidade de células que expressam NG2. O NG2 é encontrado principalmente nas CPOs e, portanto, é considerado um marcador de remielinização (Adieli e Adieli, 2017). Ainda é importante considerar que, quando comparadas a outras células constituintes da glia, as CPOs são as primeiras a reagir a danos na mielina e as que apresentam maior taxa de proliferação em resposta à desmielinização (Watanabe et al., 2002; Cenci di Bello et al., 1999; Adieli e Adieli, 2017). Esses achados, portanto, sugerem que o aumento de NG2 pode ser um mecanismo adaptativo do estriado em resposta ao dano causado pelo sulfito. Nesse contexto, estudos anteriores já mostraram que a elevação dos níveis de NG2 causada por determinados insultos que causam desmielinização, tais como lesões na coluna vertebral e esclerose

múltipla, tem o objetivo de induzir remielinização nas áreas afetadas (Watanabe et al., 2002; Cenci di Bello et al., 1999; Adieli e Adieli, 2017).

Avaliamos a seguir os efeitos da administração do sulfito sobre parâmetros indicativos de processo inflamatório em estriado de ratos. O sulfito aumentou a marcação da Iba1, bem como o número de células expressando essa proteína. Visto que essa proteína é encontrada na micróglia, os chamados macrófagos residentes do SNC, pode ser sugerido que esse metabólito induz ativação microglial e inflamação. Isso está de acordo com observações de nosso grupo mostrando que o sulfito causa reatividade glial, uma condição de resposta a dano cerebral visando a proteção de células, principalmente neurônios, por aumentar a marcação de S100B e GFAP, proteínas marcadoras de astrócitos (Anderson e Sofroniew, 2014; Sofroniew e Vinters, 2010; Grings, 2017). É importante também destacar que os astrócitos, juntamente com a micróglia, são as principais células ativadas durante processos neuroinflamatórios (McNeela et al., 2017). Além disso, o aumento da Iba1 causado pelo sulfito corrobora ao fato de esse metabólito também aumentar a marcação do NG2, já que a elevada resposta proliferativa das CPOs é comumente observada em casos de inflamação acompanhada de desmielinização (Cenci di Bello et al., 1999; Franklin, 2002).

O NFkB é um fator de transcrição ubíquo que tem importante papel na resposta imune inata induzindo a produção de ou sendo induzido por citocinas inflamatórias. Desse modo, estudamos os efeitos do sulfito sobre os níveis de RNAm tanto do NFkB quanto das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 $\beta$ . O sulfito aumentou os níveis de RNAm do NFkB, o que corrobora ao fato desse metabólito ter aumentado a marcação da Iba1, porém não modificou os níveis do RNAm das duas citocinas avaliadas. Apesar de não determinarmos as razões pelas quais os níveis de RNAm das citocinas não foram alterados, pode ser especulado que, em nossas condições experimentais, o sulfito é capaz de induzir um aumento apenas agudo dessas citocinas seguido da diminuição desses níveis. Reforçando tal hipótese,

Yamawaki e colaboradores (2018) demonstraram que a administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (5 mg/kg) aumentou os níveis de citocinas pró-inflamatórias em cérebro de camundongos 2 h após a injeção, porém esses níveis diminuíram 24 h após a administração. Por outro lado, deve ser considerado que já foi observado em outros estudos que os níveis de RNAm não necessariamente correlacionam com os níveis de determinadas proteínas (Liu et al., 2016; Payne, 2015). Assim, temos como perspectiva avaliar o efeito da administração de sulfito, em diferentes tempos de eutanásia dos animais, sobre o conteúdo protéico dessas citocinas, os níveis de RNAm e o conteúdo dessas proteínas.

Além disso, investigamos os efeitos de um pré- e pós-tratamento com BEZ nos animais que receberam a administração intraestriatal de sulfito a fim de avaliar se essa molécula com potencial neuroprotetor poderia prevenir os efeitos tóxicos do sulfito. O pré- e o pós-tratamento com BEZ preveniram a diminuição tanto dos feixes de axônios quanto da marcação da MBP induzida pelo sulfito. Já o pós-tratamento também preveniu o aumento de Iba1 e do NG2. Apesar de o pré-tratamento com BEZ não ter prevenido estatisticamente o efeito do sulfito sobre a marcação de Iba1, nossos resultados mostram que há uma tendência para um efeito protetor do BEZ sobre esse parâmetro nessas condições. Visto que o BEZ é um pan-agonista de receptores PPAR que influencia na regulação da expressão de enzimas antioxidantes, esses resultados reforçam a nossa hipótese de que o sulfito causa alterações na mielina e também neuroinflamação através do aumento na produção de radicais livres. Ainda pode ser sugerido que o sulfito causa os efeitos tóxicos acima descritos por induzir disfunção mitocondrial visto que o BEZ ativa o eixo PPAR-PGC-1 $\alpha$  que regula a biogênese mitocondrial (Desvergne e Wahli, 1999). Em consonância com isso, Grings e colaboradores (2017) demonstraram que a administração de sulfito causa dano mitocondrial e altera as defesas antioxidantes em estriado de ratos, e que esses efeitos foram prevenidos pelo pré-tratamento com BEZ. Outros trabalhos também mostraram que alterações na mielina podem

ser causadas por estresse oxidativo induzido nos oligodendrócitos, levando até mesmo à morte dessas células (Back et al., 1998; Adiele e Adiele, Article in press).

Outro ponto a ser considerado é que foram utilizadas no presente estudo duas doses de BEZ, de 30 e 100 mg/kg/dia, com o objetivo de avaliar se essa molécula exerceria um efeito protetor com perfil dose-dependência frente à toxicidade do sulfito. No entanto, essa dose-dependência não foi observada em alguns parâmetros, tais como na marcação do NG2, o que pode ser devido ao fato de que o BEZ influencia diferentes vias de sinalização, incluindo vias que regulam a expressão de defesas antioxidantes, processos inflamatórios e sobrevivência ou morte celular (Desvergne e Wahli, 1999). Portanto, é possível que a modulação diferenciada do BEZ sobre vias de sinalização distintas leve a efeitos diferenciados sobre os parâmetros analisados.

Nossos resultados evidenciam, pela primeira vez na literatura, que a administração de sulfito causa dano à mielina e neuroinflamação em estriado de ratos. Assim, pode ser presumido que esses mecanismos patológicos possivelmente contribuem para o dano nos gânglios basais observado nos pacientes com deficiência da SO. Nossa hipótese é de que o dano exercido sobre a mielina e a inflamação induzidos pelo sulfito se deve ao aumento na produção de radicais livres e alterações na função mitocondrial. Além disso, considerando que o BEZ exerceu um importante papel protetor em nosso modelo, temos a expectativa de que essa molécula possa ser um importante candidato a adjuvante na terapia para a deficiência da SO.

## **III.2. CONCLUSÕES**

- A administração de sulfito diminuiu a marcação da Fluoromielina e MBP em estriado de ratos, indicando dano à estrutura e compactação da mielina.

- A administração de sulfito aumentou a marcação de NG2 em estriado, o que sugere indução de remielinização.
- A administração de sulfito aumentou a marcação de Iba1 e os níveis do RNAm de NFkB em estriado, indicando reatividade glial e indução de inflamação em estriado.
- A administração de sulfito não alterou os níveis do RNAm das citocinas TNF e IL-1 $\beta$  em estriado.
- O pré-tratamento com BEZ preveniu as alterações na marcação da Fluoromielina, MBP e Iba1 induzidas pelo sulfito em estriado.
- O pós-tratamento com BEZ preveniu as alterações na marcação da Fluoromielina, MBP, Iba1 e NG2 induzidas pelo sulfito em estriado.

### **III.3. PERSPECTIVAS**

- Avaliar os efeitos da administração de sulfito (2 $\mu$ mol) sobre os níveis de RNAm e conteúdo proteico do NFkB, TNF e IL-1 $\beta$  em estriado de ratos eutanasiados 1 ou 3 dias após a injeção do sulfito.
- Avaliar os efeitos do pré- e pós-tratamento com BEZ (30 ou 100 mg/kg/dia) sobre as possíveis alterações detectadas nos níveis de RNAm e conteúdo proteico do NFkB, TNF e IL-1 $\beta$  causadas pelo sulfito (2 $\mu$ mol) em estriado de ratos eutanasiados 1 ou 3 dias após a injeção do metabólito.
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento com BEZ (30 ou 100 mg/kg/dia) sobre o aumento da marcação do NG2 induzido pela administração de sulfito (2 $\mu$ mol) em estriado de ratos eutanasiados 7 dias após a injeção de sulfito.

## REFERÊNCIAS

- Abedinzadeh, Z., 2001. Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol* 79, 166-70.
- Adieli, R.C., Adieli, C.A., 2017. Metabolic defects in multiple sclerosis. *Mitochondrion. Article in Press.*
- Anderson, M.A., Ao, Y., Sofroniew, M.V., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes, *Neurosci Lett* 565, 23–29.
- Back, S.A., Gan, X., Li, Y., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., 1998. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J Neurosci* 18, 6241-53.
- Baker, M.T., Dehring, D.J., Gregerson, M.S., 2002. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology* 97, 1162-7.
- Baker, M.T., Dehring, D.J., Gregerson, M.S., 2002. Sulfite supported lipid peroxidation in propofol emulsions. *Anesthesiology* 97, 1162-7.
- Bickel, H., 1987. Early diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. *Enzyme* 38, 14-26.
- Bindu, P.S., Christopher, R., Mahadevan, R., Bharath, R.D., 2011. Clinical and imaging observations in isolated sulfite oxidase deficiency. *J Child Neurol* 26, 1036-40.
- Boggs J.M., 2006. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci* 63, 1945–61.
- Boggs J.M., Rangaraj G., 2000. Interaction of lipid-bound myelin basic protein with actin filaments and calmodulin. *Biochemistry* 39, 7799–806.

- Boggs J.M., Rangaraj G., Dicko A., 2012. Effect of phosphorylation of phosphatidylinositol on myelin basic protein-mediated binding of actin filaments to lipid bilayers. *in vitro Biochim Biophys Acta* 1818, 2217–27.
- Boggs J.M., Rangaraj G., Gao W., Heng Y.M., 2006. Effect of phosphorylation of myelin basic protein by MAPK on its interactions with actin and actin binding to a lipid membrane *in vitro*. *Biochemistry* 45, 391–401.
- Boggs J.M., Rangaraj G., Heng Y.M., Liu Y., Harauz G., 2011. Myelin basic protein binds microtubules to a membrane surface and to actin filaments *in vitro*: effect of phosphorylation and deimination. *Biochim Biophys Acta* 1808, 761–73.
- Boggs J.M., Rangaraj G., Hill C.M.D., Bates I.R., Heng Y.M., Harauz G., 2005. Effect of arginine loss in myelin basic protein, as occurs in its deiminated charge isoform, on mediation of actin polymerization and actin binding to a lipid membrane *in vitro*. *Biochemistry* 44, 3524–34.
- Brinkmann, B.G., Agarwal, A., Sereda, M.W., Garratt, A.N., Müller, T., Wende, H., Stassart, R.M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., Radyushkin, K., Goebbels, S., Fischer, T.M., Franklin, R.J., Lai, C., Ehrenreich, H., Birchmeier, C., Schwab, M.H., Nave, K.A., 2008. Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* 59, 581–95.
- Cenci di Bello, I., Dawson, M.R.L., Levine, J.M., Reynolds, R., 1999. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *J Neurocytol* 28, 365–81.
- Chan, A., Magnus, T., and Gold, R., 2001. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia* 33, 87–95.

- Chan, K.Y., Li, C.K., Lai, C.K., Ng, S.F., Chan, A.Y., 2002. Infantile isolated sulphite oxidase deficiency in a Chinese family: a rare neurodegenerative disorder. *Hong Kong Med J* 8, 279-82.
- Charles, P., Hernandez, M.P., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., Lubetzki, C., 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7585–90.
- Chen, L.W., Tsai, Y.S., Huang, C.C., 2014. Prenatal multicystic encephalopathy in isolated sulfite oxidase deficiency with a novel mutation. *Pediatr Neurol* 51, 181-82.
- Colello, R.J., Pott, U., Schwab, M.E., 1994. The role of oligodendrocytes and myelin on axon maturation in the developing rat retinofugal pathway. *J Neurosci* 14, 2594–605.
- Davis, A.C., Cornelison, M.J., Meyers, K.T., Rajapakshe, A., Berry, R.E., Tollin, G., Enemark, J.H., 2013. Effects of mutating aromatic surface residues of the heme domain of human sulfite oxidase on its heme midpoint potential, intramolecular electron transfer, and steady-state kinetics. *Dalton Trans* 42, 3043-9.
- de Moura Alvorcem, L., da Rosa, M.S., Glanzel, N.M., Parmeggiani, B., Grings, M., Schmitz, F., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2017. Disruption of Energy Transfer and Redox Status by Sulfite in Hippocampus, Striatum, and Cerebellum of Developing Rats *Neurotox Res* 32, 264-75.
- Derin, N., Akpınar, D., Yargıoğlu, P., Agar, A., Aslan, M., 2009. Effect of alpha-lipoic acid on visual evoked potentials in rats exposed to sulfite. *Neurotoxicol Teratol* 31, 34-9.
- Desvergne, B., Wahli, W., 1999. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 20, 649-88.
- Dulamea, A.O., 2017. The contribution of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitor cells to central nervous system repair in multiple sclerosis: perspectives for remyelination therapeutic strategies. *Neural Regen Res* 12, 1939-44.

- Edwards, M., Roeper, J., Allgood, C., Chin, R., Santamaria, J., Wong, F., Schwarz, G., Whitehall, J., 2015. Investigation of molybdenum cofactor deficiency due to MOCS2 deficiency in a newborn baby. *Meta Gene* 3, 43-49.
- Edwards, M.C., Johnson, J.L., Marriage, B., Graf, T.N., Coyne, K.E., Rajagopalan, K.V. and MacDonald, I.M., 1999. Isolated sulfite oxidase deficiency: review of two cases in one family. *Ophthalmology* 106, 1957-61.
- Engelen, M., Schackmann, M.J.A., Ofman, R., Sanders, R.J., Dijkstra, I.M., Houten, S.M., Fourcade, S., Pujol, A., Poll-The, B.T., Wanders, R.J.A., Kemp, S., 2012. Bezafibrate lowers very long-chain fatty acids in X-linked adrenoleukodystrophy fibroblasts by inhibiting fatty acid elongation. *J Inherit Metab Dis* 35, 1137-45.
- Eugene Knox, W., 1958. Sir Archibald Garrod's "Inborn Errors of Metabolism". II. Alkaptonuria. *Am J Hum Genet* 10, 95-124.
- Fewou, S.N., Ramakrishnan, H., Büssow, H., Gieselmann, V., Eckhardt, M., 2007. Down-regulation of polysialic acid is required for efficient myelin formation. *J Biol Chem* 282, 16700-11.
- Franklin, R.J., 2002. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-14.
- Franklin, R.J., 2002. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-14.
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J.J., and Tang, Y., 2014. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol* 49, 1422-34.
- Garret, R.M., Rajagopalan, K.V., 1996. Site-direct mutagenesis of recombinant sulfite oxidase: identification of cysteine 207 as a ligand of molybdenum. *J Biol Chem* 271, 7387-91.

- Gerondakis, S., Fulford, T.S., Messina, N.L., 2014. NF-kappaB control of T cell development. *Nat Immunol* 15, 15–25.
- Goebbels, S., Wieser, G.L., Pieper, A., Spitzer, S., Weege, B., Yan, K., Edgar, J.M., Yagensky, O., Wichert, S.P., Agarwal, A., Karram, K., Renier, N., Tessier-Lavigne, M., Rossner, M.J., Káradóttir, R.T., Nave, K.A., 2017. A neuronal PI(3,4,5)P3-dependent program of oligodendrocyte precursor recruitment and myelination. *Nat Neurosci* 20, 10–15.
- Grings, M., Moura, A.P., Amaral, A.U., Parmeggiani, B., Gasparotto, J., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2014. Sulfite disrupts brain mitochondrial energy homeostasis and induces mitochondrial permeability transition pore opening via thiol group modification. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1413-22.
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Marcowich, G.F., Amaral, A.U., de Souza Wyse, A.T., Wajner, M., Leipnitz, G., 2013. Disturbance of brain energy and redox homeostasis provoked by sulfite and thiosulfate: Potential pathomechanisms involved in the neuropathology of sulfite oxidase deficiency. *Gene* 531, 191-8.
- Grings, M., Moura, A.P., Parmeggiani, B., Pletsch, J.T., Cardoso, G.M.F., August, P.M., Matté, C., Wyse, A.T.S., Wajner, M., Leipnitz, G., 2017. Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: Implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1863, 2135-48.
- Hamby, M.E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D.H., Khakh, B.S., & Sofroniew, M.V., 2012. Inflammatory Mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple g-proteincoupled receptors. *J Neurosci* 32, 14489–510.

- Han, H., Myllykoski, M., Ruskamo, S., Wang, C., Kursula, P., 2013. Myelin-Specific Proteins: A structurally diverse group of membrane-interacting molecules. *Biofactors* 39, 233-41.
- Harauz, G. and Libich, D.S., 2009. The classic basic protein of myelin—conserved structural motifs and the dynamic molecular barcode involved in membrane adhesion and protein-protein interactions. *Curr Protein Pept Sci* 10, 196–215.
- Harauz, G. and Libich, D.S., 2009. The classic basic protein of myelin—conserved structural motifs and the dynamic molecular barcode involved in membrane adhesion and protein-protein interactions. *Curr Protein Pept Sci* 10, 196–215.
- Harauz, G., Boggs, J.M., 2013. Myelin management by the 18.5-kDa and 21.5-kDa classic myelin basic protein isoforms. *J Neurochem* 125, 334-61.
- Harline D.K. and Colman, D.R., 2007. Rapid conduction and the evolution of glial axons and myelinated fibers. *Curr Biol* 17, 29-35.
- Hayon, E., Treinin, A., Wilf, J., 1972. Electronic spectra, photochemistry, and autoxidation mechanism of the sulfite-bisulfite-pyrosulfite systems. The  $\text{SO}_2^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^-$ , and  $\text{SO}_5^-$  radicals. *J Am Chem Soc* 94, 47-57.
- Herken, E.N., Kocamaz, E., Erel, O., Celik, H., Kucukatay, V., 2009. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfhydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. *Cell Biol Toxicol* 25, 355-62.
- Hines, D.J., Hines, R.M., Mulligan, S.J., & Macvicar, B.A., 2009. Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57, 1610–18.

- Hobson, E.E., Thomas, S., Crofton, P.M., Murray, A.D., Dean, J.C. and Lloyd, D., 2005. Isolated sulphite oxidase deficiency mimics the features of hypoxic ischaemic encephalopathy. *Eur J Pediatr* 164, 655-9.
- Holder, J.L. Jr., Agadi, S., Reese, W., Rehder, C., Quach, M.M., 2014. Infantile spasms and hyperekplexia associated with isolated sulfite oxidase deficiency. *JAMA Neurol* 71, 782-84.
- Hotamisligil, G.S., 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–7.
- Hughes, E.G., Kang, S.H., Fukaya, M., and Bergles, D.E., 2013 . Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 16, 668–76.
- Jakovcevski, I., Mo, Z., Zecevic, N., 2007. Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the onset of myelination in the human fetal forebrain. *Neuroscience* 149, 328–37.
- Janeway, C.A., 1992. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Tod* 13, 11–16.
- Ji, A.J., Savon, S.R. and Jacobsen, D.W., 1995. Determination of total serum sulfite by HPLC with florescence detection. *Clin Chem* 41, 897-903.
- Johnson, J.L., 2003. Prenatal diagnosis of molybdenum cofactor deficiency and isolated sulfite oxidase deficiency. *Prenat Diagn* 23, 6-8.
- Johnson, J.L., Duran, M., 2001. Molybdenum Cofactor Deficiency and Isolated Sulfite Oxidase Deficiency, in: Scriver, CR, B.A., Valle, D., Sly, W.S., (Ed.), *The Metabolic Bases of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3181-3217.
- Johri, A., Calingasan, N.Y., Hennessey, T.M., Sharma, A., Yang, L., Wille, E., Chandra, A., Beal, M.F., 2012. Pharmacologic activation of mitochondrial biogenesis exerts

- widespread beneficial effects in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 21, 1124-37.
- Kang, S.H., Fukaya, M., Yang, J.K., Rothstein, J.D., and Bergles, D.E., 2010. NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68, 668–81.
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., and Richardson, W.D., 2006. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci* 9, 173–79.
- Kigerl, K.A., de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Popovich, P.G., and Keane, R.W., 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258, 5–16.
- Kigerl, K.A., de Rivero Vaccari, J.P., Dietrich, W.D., Popovich, P.G., and Keane, R.W., 2014. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. *Exp Neurol* 258, 5–16.
- Kisker, C. Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W.A., Garret, R.M., Rajagopalan, K.V., Enemark, J.H. and Rees, D.C., 1997. Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell* 91, 973-83.
- Knapik-Czajka, M., 2013. Stimulation of rat liver branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase activity by low doses of bezafibrate, *Toxicology* 306, 101–7.
- Kotas, M.E., & Medzhitov, R., 2015. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. *Cell* 160, 816–27.
- Kreutzberg, G.W., 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312–18.
- Krigbaum, W.R. and Hsu, T.S., 1975. Molecular conformation of bovine A1 basic protein, a coiling macromolecule in aqueous solution. *Biochemistry* 14, 2542–46.

- Kucharova, K., Stallcup, W.B., 2010. The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination. *Neuroscience* 166, 185-94.
- Kucukatay, V., Hacioglu, G., Savcioglu, F., Yargicoglu, P., Agar, A., 2006. Visual evoked potentials in normal and sulfite oxidase deficient rats exposed to ingested sulfite. *Neurotoxicology* 27, 93-100.
- Kumar, A., Dejanovic, B., Hetsch, F., Semtner, M., Fusca, D., Arjune, S., Santamaria-Araujo, J.A., Winkelmann, A., Ayton, S., Bush, A.I., Kloppenburg, P., Meier, J.C., Schwarz, G., Belaidi, A.A., 2017. S-sulfocysteine/NMDA receptor-dependent signaling underlies neurodegeneration in molybdenum cofactor deficiency. *J Clin Invest* 127, 4365-78.
- Laursen, L.S., Chan, C.W., French-Constant, C., 2009. An integrin/contactin complex regulates CNS myelination by differential Fyn phosphorylation. *J Neurosci* 29, 9174–85.
- Lee, S., Leach, M.K., Redmond, S.A., Chong, S.Y., Mellon, S.H., Tuck, S.J., Feng, Z.Q., Corey, J.M., Chan, J.R., 2012. A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nat Methods* 9, 917–22.
- Lee, Y., Morrison, B.M., Li, Y., Lengacher, S., Farah, M.H., Hoffman, P.N., Liu, Y., Tsingalia, A., Jin, L., Zhang, P.W., Pellerin, L., Magistretti, P.J. and Rothstein, J.D., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* 487, 443-48.
- Levine, J.M., Reynolds, R., Fawcett, J.W., 2001. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24, 39–47.
- Liu, Y., Beyer, A., Aebersold, R., 2016. On the dependency of cellular protein levels on mRNA abundance. *Cell* 165, 535–550.

- Lu, Q.R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C.D., and Rowitch, D.H., 2002. Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection. *Cell* 109, 75–86.
- Lutton, J.D., Winston, R., and Rodman, T.C., 2004. Multiple sclerosis: etiological mechanisms and future directions. *Exp Biol Med (Maywood)* 229, 12–20.
- Mak, C.M., Lee, H.C, Chan, A.Y. and Lam, C.W., 2013. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 50, 142-62.
- McNeela, A.M., Bernick, C., Hines, R.M., Hines, D.J., 2017. TSPO regulation in reactive gliotic diseases. *J Neurosci Res*, 1-11.
- Mi, S., Miller, R.H., Lee, X., Scott, M.L., Shulag-Morskaya, S., Shao, Z., Chang, J., Thill, G., Levesque, M., Zhang, M., Hession, C., Sah, D., Trapp, B., He, Z., Jung, V., McCoy, J.M., Pepinsky, R.B., 2005. LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8, 745–751
- Moscarello, M.A., Wood, D.D., Ackerley, C., and Boulias, C., 1994. Myelin in multiple sclerosis is developmentally immature. *J Clin Invest* 94, 146–54.
- Moura, A.P., Parmeggiani, B., Gasparotto, J., Grings, M., Cardoso, G.M.F., Seminotti, B., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P., Wajner, M., Leipnitz, G., 2017 Glycine administration Alters MAPK signaling pathways and causes neuronal damage in rat brain: putative mechanisms involved in the neurological dysfunction in neukeotic hyperglycinemia. *Mol Neurobiol*, 1-10.
- Musse, A.A., Gao, W., Homchaudhuri, L., Boggs, J.M., and Harauz, G., 2008. Myelin basic protein as a “PI(4,5)P2-modulin”: a new biological function for a major central nervous system protein. *Biochemistry* 47, 10372–82.
- Nakajima, T., Tanaka, N., Kanbe, H., Hara, A., Kamijo, Y., Zhang, X., Gonzalez, F.J., Aoyama, T., 2009. Bezafibrate at clinically relevant doses decreases serum/liver

- triglycerides via down-regulation of sterol regulatory element-binding protein-1c in mice: a novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent mechanism. *Mol Pharmacol* 75, 782–92.
- Nave, K.A., 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468, 244-52.
- Noe, N., Dillon, L., Lellek, V., Diaz, F., Hida, A., Moraes, C.T., Wenz, T., 2013. Bezafibrate improves mitochondrial function in the CNS of a mouse model of mitochondrial encephalopathy. *Mitochondrion* 13, 417-26.
- Oeckinghaus, A., Ghosh, S., 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a000034.
- Oliveira-Bravo, S., Isasi, E., Fernández, A., Rosillo, J.C., Jiménez, M., Casanova, G., Sarlabós, M.N., Barbeito, L., 2014. White matter injury induced by perinatal exposure to glutaric acid. *Neurotox Res* 25, 381-91.
- Ozturk, O.H., Otkar, S., Aydin, M. and Kucukatay, V., 2010. Effect of sulfite on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in normal and sulfite oxidase-deficient rat erythrocytes. *J Physiol Biochem* 66, 205-12.
- Parmeggiani, B., Moura, A.P., Grings, M., Bumbel, A.P., de Moura Alvorcem, L., Tauana Pletsch, J., Fernandes, C.G., Wyse, A.T., Wajner, M., Leipnitz, G., 2015. In vitro evidence that sulfite impairs glutamatergic neurotransmission and inhibits glutathione metabolism-related enzymes in rat cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 42, 68-75.
- Payne, S.H., 2015. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci* 40, 1–3.
- Paxinos, G., Watson, C., 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, second ed., Academic Press, San Diego.
- Polito, A., Reynolds, R., 2005. NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207, 707-16.

- Ramos, J.M.P., Bussi, C., Gaviglio, E.A., Arroyo, D.S., Baez, N.S., Rodriguez-Galan, M.C., Iribarren, P., 2017. Type I IFNs are required to Promote central nervous system immune surveillance through the recruitment of inflammatory Monocytes upon systemic inflammation. *Front Immunol* 8, 1666.
- Rivers, L.E., Young, K.M., Rizzi, M., Jamen, F., Psachoulia, K., Wade, A., Kessaris, N., and Richardson, W.D., 2008. PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11, 1392–1401.
- Saab, A.S., Tzvetavona, 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., 2016. Oligodendroglial nmda receptors regulate glucose import and axonal energy metabolism. *Neuron* 91, 119–32.
- Sass, J.O., Gunduz A., Araujo Rodrigues Funayma, C., Korkmaz, B., Dantas Pinto, K.G., Tuysuz, B., Yanasse Dos Santos, L., Taskiran, E., de Fátima Turcato, M., Lam, C.W., Reiss, J., Walter, M., Yalcinkaya, C., Camelo Junior, J.S., 2010. Functional deficiencies of sulfite oxidase: Differential diagnoses in neonates presenting with intractable seizures and cystic encephalomalacia. *Brain Dev* 32, 544-9.
- Schwahn, B.C., Van Spronsen, F.J., Belaidi, A.A., Bowhay, S., Christodoulou, J., Derks, T.G., Hennermann, J.B., Jameson, E., König, K., McGregor, T.L., Font-Montgomery, E., Santamaria-Araujo, J.A., Santra, S., Vaidya, M., Vierzig, A., Wassmer, E., Weis, I., Wong, F.Y., Veldman, A. and Schwarz, G., 2015. Efficacy and safety of cyclic pyranopterin monophosphate substitution in severe molybdenum cofactor deficiency type A: a prospective cohort study. *Lancet* 386, 1955-63.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., and Valle, D., 2001. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8 ed, McGraw-Hill, New York.

- Sinclair, L.A., 1982. A new look at the inborn errors of metabolism. *Ann Clin Biochem* 19, 314-321.
- Smith, J.A., Das, A., Ray, S.K., Banik, N.L., 2012. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 87, 10-20.
- Smith, R., 1977. Non-covalent cross-linking of lipid bilayers by myelin basic protein: a possible role in myelin formation. *Biochim Biophys Acta* 470, 170–84.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology, *Acta Neuropathol* 119, 7–35.
- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A., 1999. Reactive microgliosis. *Progr Neurobiol* 57, 563–81.
- Tan, W.H., Eichler, F.S., Hoda, S., Lee, M.S., Baris, H., Hanley, C.A., Grant, P.E., Krishnamoorthy, K.S., Shih, V.E., 2005. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics* 116, 757-66.
- Tan, W.H., Eichler, F.S., Hoda, S., Lee, M.S., Barris, H., Hanley, C.A., Grant, P.E., Krishnamoorthy, K.S. and Shih, V.E., 2005. Isolated sulfite oxidase deficiency: a case report with a novel mutation and review of the literature. *Pediatrics* 116, 757-66.
- Tay, T.L., Mai, D., Dautzenberg, J., Fernandez-Klett, F., Lin, G., 2017. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci* 20, 793–803.
- Touati, G., Rusthoven, E., Depondt, E., Dorche, C., Duran, M., Heron, B., Rabier, D., Russo, M. and Saudubray, J.M., 2000. Dietary therapy in two patients with a mild form of sulphite oxidase deficiency. Evidence for clinical and biological improvement. *J Inherit Metab Dis* 23, 45-53.

- Trapp, B.D., Kidd, G.J., 2004. Structure of the myelinated axon. In: Lazzarini, R.A., Griffin, J.W., Lassman, H., Nave, K.A., Miller, R.H., Trapp, B.D., editors. *Myelin Biology and Disorders*. Elsevier Academic Press; San Diego: 2004. p. 3-27.
- Tzakos, A.G., Troganis, A., Theodorou, V., Tselios, T., Svarnas, C., 2005. Structure and function of the myelin proteins: current status and perspectives in relation to multiple sclerosis. *Curr Med Chem* 12, 1569–87.
- Vijayakumar, K., Gunny, R., Grunewald, S., Carr, L., Chong, K.W., DeVile, C., Robinson, R., McSweeney, N., Prabhakar, P., 2011. Clinical neuroimaging features and outcome in molybdenum cofactor deficiency. *Pediatr Neurol* 45, 246-52.
- Wang, C., Neugebauer, U., Burck, J., Myllykoski, M., Baumgartel, P., 2011. Charge isomers of myelin basic protein: structure and interactions with membranes, nucleotide analogues, and calmodulin. *PLoS One* 6, e19915.
- Wang, C., Neugebauer, U., Burck, J., Myllykoski, M., Baumgartel, P., 2011. Charge isomers of myelin basic protein: structure and interactions with membranes, nucleotide analogues, and calmodulin. *PLoS One* 6, e19915.
- Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, C., Weinmaster, G., Barres, B.A., 1998. Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21, 63–75.
- Watanabe, M., Toyama, Y., Nishiyama, A., 2002. Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res* 69, 826–36.
- Westerlinck, H., Meylaerts, L., Van Hoestenbergh, M.R., Rossi, A., Sulfite oxidase deficiency in a newborn. *JBR-BTR* 97, 113-4.
- Yamawaki, Y., Yoshioka, N., Nozaki, K., Ito, H., Oda, K., Harada, K., Shirawachi, S., Asano, S., Aizawa, H., Yamawaki, S., Kanematsu, T., Akagi, H., 2018. Sodium butyrate

abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. *Brain Res* 1680, 13-38.

Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., and Richardson, W.D., 2013. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873–85.

Zhang, X., Vincent, A.S., Halliwell, B., Wong, K.P., 2004. A mechanism of sulfite neurotoxicity: direct inhibition of glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* 279, 43035-