

EL PEZ CEBRA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE

Tássia Flávia Dias Castro¹, Luciana Crepaldi Lunkes¹, Bárbara Do Carmo Rodrigues Virote¹, Débora Almeida Galdino Alves¹, Ana Paula Peconick², Luis David Solis Murgas²

Fecha de recepción: 2 de septiembre de 2017
Fecha de aceptación: 11 de noviembre de 2017

¹ Programa de Postgrado en Ciencias Veterinarias. Universidad Federal de Lavras. Lavras - MG, Brasil

² Universidad Federal de Lavras. Lavras -MG, Brasil. ismurgas@dmv.ufla.br (autor de correspondencia)

RESUMEN

La esclerosis múltiple se caracteriza por la pérdida de mielina y axones, lo que lleva al deterioro neurológico progresivo. Las manifestaciones clínicas en la mayoría de los pacientes indican la implicación del sistema motor y sensorial y del tronco encefálico. El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica sobre la utilización del pez cebra como modelo experimental asociado a la esclerosis múltiple, a través de un levantamiento de los principales datos publicados en los últimos cinco años. El modelo pez cebra presenta como ventajas el fácil mantenimiento, bajo costo, fácil reproducción, fecundación externa, alta fecundidad alcanzando y transparencia de los embriones en las etapas embrionario/larval. Además, su genoma presenta al menos un 70% de homología con el del ser humano y la disponibilidad de un conjunto de herramientas moleculares, permitiendo alteraciones genéticas que simulan enfermedades humanas. Actualmente el modelo pez cebra está siendo utilizado para identificar los perfiles de expresión génica de oligodendrocitos en diferentes etapas de remielinización, para identificar blancos genéticos y moleculares para el desarrollo terapéutico de nuevos compuestos pro-mielinizantes. De esta forma este modelo para el estudio de la esclerosis múltiple tiene ventajas sobre otros modelos animales por ser un buen candidato para test con medicamentos.

Palabras clave: neuronal, degeneración, peces, sistema nervioso

ZEBRA FISH AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR THE STUDY OF MULTIPLE SCLEROSIS

ABSTRACT

Multiple sclerosis is characterized by loss of myelin and axons, leading to progressive neurological deterioration. Clinical manifestations in the majority of patients indicate the involvement of the motor and sensory system and the brainstem. The objective of this work was to perform a bibliographic review of the use of zebrafish as an experimental model for multiple sclerosis, making a survey of the main data published in the last five years. The zebrafish model presents advantages such as easy maintenance, low cost, easy reproduction, external fertilization, high-achieving fecundity and transparency of the embryos in the embryonic/larval stages. In addition, its genome has at least 70% homology with that of human beings, as well as the availability of a set of molecular tools, allowing genetic alterations that simulate human diseases. Currently, the zebrafish model is being used to identify the gene expression profiles of oligodendrocytes in different stages of demyelization to identify genetic and molecular targets for the therapeutic development of new pro-myelinating compounds. Thus, this model for the study of multiple sclerosis has advantages over other animal models because it is a good candidate for drug tests.

Keywords: neuronal, degeneration, fish, nervous system

INTRODUCCIÓN

La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad inflamatoria, autoinmune, crónica, desmielinizante y degenerativa del sistema nervioso central (SNC). Su etiología aún no está totalmente comprendida, sin embargo, se sabe que, probablemente, se deriva de interacciones complejas entre el ambiente, factores hereditarios, además del propio sistema inmunológico del organismo (Garg y Smith, 2015). Los ataques inmunológicos son mediados por células T o B, que atacan el complejo mielina-oligodendrocito del cerebro y médula espinal. El pico de incidencia de la enfermedad ocurre en torno a los 30 años, mientras que el pico de prevalencia se presenta aproximadamente a los 50 años. Se estima que alrededor de 2,5 millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por esta enfermedad (Files et al., 2015).

La MS se caracteriza por la pérdida de mielina y axones, lo que lleva al deterioro neurológico progresivo. Las manifestaciones clínicas en la mayoría de los pacientes indican la implicación del sistema motor y sensorial y del tronco encefálico (Garg y Smith, 2015). Entre los principales síntomas de la enfermedad están el comprometimiento de la memoria, dificultad en los movimientos, habla y deglución, dolores articulares, adormecimientos, alteraciones neuropsiquiátricas (ansiedad y depresión), parálisis total o parcial de una parte del cuerpo, pérdida de la visión en uno o ambos los ojos, las sensaciones de hormigueo, temblores, mareos y fatiga intensa (Mendes et al., 2000). La fatiga es uno de los más frecuentes e incapacitantes síntomas, siendo que cerca de ocho de cada 10 personas con MS presentan sensaciones de cansancio físico y mental, pérdida de energía o incluso agotamiento y debilidad muscular, pudiendo estar presente en todas las formas evolutivas de la enfermedad y manifestar a cualquier hora del día (Pavan et al., 2006).

El diagnóstico de la enfermedad no es fácil y puede tardar algunos años en hacerse correctamente, ya que los síntomas se asemejan en algunos casos con otros tipos de enfermedades del sistema nervioso. Debido a los síntomas iniciales, a menudo los pacientes no buscan orientación médica. El diagnóstico se basa en la evidencia clínica y radiológica de las lesiones inflamatorias que se distribuyen por el SNC y se desarrollan a lo largo del tiempo (Luchtman et al., 2014).

El tratamiento de la MS tiene por objetivo disminuir la actividad del sistema inmunológico, reduciendo la inflamación de las neuronas para evitar que la degeneración continúe y que se amenicen los síntomas, a través del uso de drogas inmunomoduladoras e inmunosupresoras. Además, los síntomas motores y los neuropsiquiátricos, en general, se tratan con medicamentos o con técnicas de rehabilitación (Garg y Smith, 2015).

El objetivo de este trabajo fue realizar una revisión bibliográfica sobre la utilización del pez cebra como modelo experimental asociado a la esclerosis múltiple, a través de un levantamiento de los principales datos publicados en los últimos años.

Inmunopatología de la Esclerosis Múltiple

La MS es una enfermedad autoinmune del Sistema Nervioso Central (SNC) caracterizada por la destrucción de la mielina en el cerebro y la médula espinal. Hay una inflamación en la sustancia blanca del SNC con desmielinización secundaria, caracterizada por debilidad muscular, parálisis y síntomas oculares. Los factores ambientales y genéticos pueden contribuir a su aparición como, por ejemplo, algunos individuos con predisposición genética presentando el fenotipo de MHC clase II y HLA-DR2 y HLA-DR4. A pesar de que el cerebro es considerado un órgano favorecido inmunológicamente, la MS aparece como una enfermedad inmunológica con su fisiopatología que involucra al SNC (Hemer et al., 2006; Dargahi et al., 2017).

Las células de la microglia, que regulan las moléculas de MHC clase I y II, secretan citocinas y quimiocinas y la entrada de células T (CD4 y CD8), células B, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Las células inmunológicas infiltradas secretan citocinas pro-inflamatorias, óxido nítrico que conduce a la destrucción de la mielina. Las células T auto-reactivas a la mielina cruzan la barrera hematoencefálica migrando hacia el SNC consecuentemente inicia una cascada inflamatoria (Dargahi et al., 2017, Sospedra y Martin, 2005).

La MS se caracteriza por células T CD4+ de las subpoblaciones TH1 y TH17 que reaccionan contra los antígenos propios de la mielina, resultando en inflamación en el SNC con activación de macrófagos alrededor de los nervios del cerebro y de la médula espinal, destruyendo la mielina y llevando a las anormalidades en la conducción nerviosa y déficits neurológicos. Tanto el sistema inmune innato como el adaptativo están involucrados en la fisiopatología de la MS, como los macrófagos, monocitos y células dendríticas del sistema innato y las células T y B del sistema inmune adaptativo (Frohman et al. 2006; Palmer et al., 2006; Tabarkiewicz et al., 2015).

La predisposición genética combinada a un factor ambiental desconocido, establece o mantiene las células T auto-reactivas en un período de latencia por cerca de 20 a 30 años, siendo estas activadas por un factor sistémico o local. Una vez activadas estas células pasan por la barrera hematoencefálica y al ser expuestas nuevamente al auto-antígeno, inician una reacción inflamatoria mediada por células Th-1 (Kalaur et al., 2016).

La respuesta inmune mediada por células T es el más probable causante de la MS, pero existen otros factores, como la acción de los anticuerpos, así como otros mediadores sobre la mielina (Mirshafiey y Niaragh, 2010).

Hay estudios sobre la fisiopatología de la MS en los que los modelos experimentales se inducen a una encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE). La EAE es inducida por la inmunización de animales con los antígenos normalmente presentes en la mielina del SNC, tales como proteína básica de mielina, proteína proteolipídica y glicoproteína oligodendrocitaria de mielina, con un adyuvante que contiene micobacterias muertas por el calor, lo que es necesario para disparar una respuesta fuerte de células T. Al cabo de 1 a 2 semanas después de la inmunización, los animales desarrollan encefalomiелitis, caracterizada por infiltrados perivasculares compuestos de linfocitos y macrófagos en la sustancia blanca del SNC, seguidos de desmielinización. Las lesiones neurológicas pueden ser leves y autolimitadas o crónicas y recurrentes. Estas lesiones resultan en parálisis progresiva o con remisión y recidiva. La enfermedad también puede transferirse a animales no inmunizados por la transferencia de células T de los animales enfermos (Mangiardi et al., 2011).

En experimentación animal, la EAE es causada por células TH1 CD4 + y TH17 activadas específicas para antígenos de proteínas en mielina. Por analogía con la enfermedad experimental, se cree que la MS también es causada por las células TH1 y TH17 específicas de la mielina. Estas células se detectaron en la sangre y en el SNC de los pacientes con MS. El mecanismo por el cual estas células se activan en seres humanos con MS aún se desconoce. Se sugiere que una infección (viral), pueda activar las células T reactivas a la mielina propia por el fenómeno de mimetismo molecular (Tahmasebinia y Pourgholaminejad, 2017). La autotolerancia puede fallar debido a cambios genéticos. Estas observaciones implican factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad, pero también indican que la genética sólo puede contribuir con una parte del riesgo. Los polimorfismos genéticos asociados a la MS incluyen el locus HLA, con los alelos HLADRB1 (Maddur et al., 2012).

Una asociación interesante ocurre con un polimorfismo en la región no codificante del gen para la cadena α del receptor de IL-2, CD25. Este polimorfismo puede alterar la generación y el mantenimiento de las células T efectoras y / o reguladoras. Otros estudios sugirieron que el mantenimiento periférico de las células T reguladoras es defectuoso en pacientes con MS, pero no se sabe cuánto contribuye a una falla de la autotolerancia (Tahmasebinia y Pourgholaminejad, 2017). Una vez que las células específicas de mielina T son activadas, migran al SNC, donde encuentran las proteínas de la mielina y liberan citocinas, que reclutan

y activan macrófagos y más células T, llevando a la destrucción de la mielina. Los estudios de EAE sugieren que la enfermedad se propaga a través de un proceso conocido como dispersión de epítomos (Mangiardi et al., 2011; Voggel et al., 2013).

Un hallazgo reciente es el uso exitoso del anticuerpo anti-CD20 (rituximab), que depleta sólo las células B, para el tratamiento de enfermedades causadas principalmente por la inflamación mediada por células T. Este tratamiento ha demostrado eficacia en pacientes con MS u otros trastornos autoinmunes. La eficacia del anti-CD20 puede estar relacionada con un papel de las células B en las respuestas de las células T, especialmente la generación y el mantenimiento de las células T de memoria (Kappos et al., 2011; Hausser et al., 2008; Torres y Merino, 2016).

El Pez Cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleósteo de agua dulce tropical originario del noreste de la India, Bangladesh y Nepal (Shin y Fishman, 2002). Recibe este nombre por tener un patrón de rayas horizontales, siendo que la coloración de éstas puede cambiar de más clara a más oscura dependiendo de las circunstancias y del ambiente en que se encuentra el individuo (Engeszter et al., 2007).

Este modelo de investigación científica presenta ventajas de fácil mantenimiento, bajo costo, fácil reproducción, fecundación externa, alta fecundidad alcanzando hasta 200 embriones por hembra a cada siete días, transparencia de los embriones en las etapas embrionario/larval. Además, su genoma presenta al menos un 70% de homología con el del ser humano y la disponibilidad de un conjunto de herramientas moleculares, permitiendo alteraciones genéticas que simulan enfermedades humanas (Pulak, 2015). Debido a sus características se ha convertido en un modelo experimental ampliamente aceptado para investigar enfermedades humanas hematopoyéticas, cardiovasculares, metabólicas y neurodegenerativas (Villegas, 2015).

Por el hecho de que los embriones presentan un desarrollo muy rápido, sus axones comienzan a mielificar al tercer día, cuando todavía es un pequeño embrión, y debido a su transparencia, permite a los investigadores observar la mielinización del SNC en tiempo real con la ayuda de proteínas fluorescentes. Así, disminuye drásticamente el tiempo necesario para investigar los aspectos moleculares de la mielinización o para evaluar los efectos positivos y negativos de las moléculas en el desarrollo glial (Preston y Macklin, 2015).

Como el pez cebra comparte gran parte de su genoma con humanos, se piensa que los procesos genéticos y fisiológicos de mielinización están bien conservados en otros vertebrados, incluso humanos (Preston y Macklin, 2015). Por lo tanto, se trata de un modelo emergente prometedor que involucra los procesos de

desmielinización autoinmune y neurodegeneración, condiciones asociadas a la encefalomiелitis autoinmune o EM (Kulkarni et al., 2017).

Transgénicos

Como los mecanismos de mielinización de oligodendrocitos en el SNC han sido difíciles de abordar usando el cultivo celular "in vivo", o debido a los costos para realizar modificaciones en el genoma de ratas, resulta interesante el uso del pez cebra para la investigación de la mielinización a partir de la modificación de su genoma. En las investigaciones de MS, se utilizan líneas transgénicas de pez cebra que expresan proteína fluorescente verde (GFP) en oligodendrocitos y células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), permitiendo la visualización de varios aspectos de la interacción entre OPC, oligodendrocitos, axones y mielina en el desarrollo del pez cebra.

Para controlar el comportamiento de las células precursoras de oligodendrocitos en tiempo real, como el espaciamiento entre ellas y sus procesos de mielinización, una línea transgénica Tg (nkx2.2a: megfp) fue utilizada por Kirby et al. (2006). Para los mecanismos subyacentes a la mielinización in vivo, Jung et al. (2010) desarrollaron un pez cebra transgénico (Tg (mbp: egfp)) que expresa la proteína fluorescente EGFP, tanto en embriones y en adultos, convirtiéndose en un modelo animal para estudiar diferenciación de oligodendrocitos y mielinización in vivo.

Yin y Hu (2013) examinaron los efectos al eliminar el gen *lingo1b* en el desarrollo del pez cebra, lo que resultó en anomalías como disminución de la pigmentación, reducción en el diámetro ocular y una curvatura de la médula espinal. La regulación dinámica del número de mielina por oligodendrocitos in vivo también utilizó una línea transgénica a partir de la manipulación de la función de la Fynkinasa, que en los oligodendrocitos aumenta o disminuye la cantidad de mielina en la célula (Czopka et al. 2013), pudiendo acompañar la mielinización en tiempo real.

Además de la mielinización, también existen modelos transgénicos en estudios asociados a cómo los oligodendrocitos reaccionan al evento de desmielinización. Chung et al. (2013) desarrollaron una línea transgénica Tg (mbp: gal4-*vp16*, *ulas: nfsB-mcherry*) que expresa el gen bacteriano *nfsB*, el cual codifica una enzima nitroreductasa (NTR) que puede convertir pro fármacos como metronidazol en citotoxinas, llevando a rápida remoción de oligodendrocitos y la desmielinización del SNC en larvas y adultos.

Modelando los procesos de Esclerosis Múltiple

El modelado de la MS traería una mejor comprensión de la enfermedad, siendo útil para mejorar el entendimiento para la aplicación de medicamentos con precisión. Aunque es difícil debido a la naturaleza compleja de la enfermedad. Pero, puede ser enfocada en diferentes factores biológicos, como escala de

genes y vías de señalización de las interacciones célula-célula, interacción entre procesos inflamatorios y degenerativos en nivel de tejido y previsión de resultados clínicos. Un ejemplo de estudio para modelar redes genéticas en MS fue realizado por Baranzini et. al (2009), que hicieron un estudio de asociación genómica (GWAS) de un número de pacientes con MS. Con este enfoque, identificaron varias vías asociadas a la enfermedad como la activación de leucocitos, apoptosis y regulación positiva del proceso metabólico de las macromoléculas.

Pero, puede ser enfocada en diferentes factores biológicos, como escala de genes y vías de señalización de las interacciones célula-célula, interacción entre procesos inflamatorios y degenerativos al nivel de tejido y previsión de resultados clínicos. Un ejemplo de estudio para modelar redes genéticas en MS fue realizado por Baranzini et. (2009), que hicieron un estudio de asociación genómica (GWAS) de un número de pacientes con MS. Con este enfoque, identificaron varias vías asociadas a la enfermedad como la activación de leucocitos, apoptosis y regulación positiva del proceso metabólico de las macromoléculas.

Kotelnikova et al. (2017) muestran que para un estudio efectivo de la MS es necesario tener un modelo dinámico completo que debe ser capaz de explicar el proceso autoinmune, cruzamiento de la barrera sangre-cerebro y los daños derivados de la enfermedad en el SNC en términos de interacciones célula-célula para definir la conexión entre procesos perjudicando el SNC y los resultados clínicos.

El pez cebra puede potencialmente cumplir el requisito para un modelo de mielinización de alto rendimiento, combinando la velocidad de un modelo in vitro con el contexto de un sistema de vertebrados in vivo, siendo fácil de manipular genéticamente (Buckley et al., 2008). Según McGown et al. (2017) este modelo está siendo utilizado actualmente para identificar los perfiles de expresión génica de oligodendrocitos en diferentes etapas de remielinización, para identificar blancos genéticos y moleculares para el desarrollo terapéutico de nuevos compuestos pro-mielinizantes.

Medicamentos

La MS puede conducir a las deficiencias que se acumulan a lo largo del tiempo de forma progresiva, causando incapacidad funcional. El tratamiento supone la mejora de los comprometimientos funcionales, principalmente durante las fases más agudas, como por ejemplo el uso de glucocorticosteroides. Además de esto, el tratamiento basado en la modulación inmunológica es realizado de forma profiláctica. En los pacientes más avanzados, los cuales prácticamente todos relatan síntomas, el tratamiento es basado en los comprometimientos funcionales y emocionales. Espasticidad, distúrbios urológicos, depresión y dolor son los síntomas comúnmente observados. El tratamiento sintomático incluye medicamentos (tratamiento farmacológico), fisioterapia y psicoterapia (no farmacológico) (Skielo; Rommer; Zettl, 2017; Compston, Coles,

2008; Wiendl et al., 2008).

Las maneras en que la MS puede ser objetivo terapéutico se asocian a la respuesta inmune inflamatoria siendo suprimida y el intento de disminuir o estancar la progresión de la enfermedad a través del desarrollo de terapias destinadas a mantener la supervivencia de los axones, por ejemplo, promoviendo el proceso de remielinización (Franklin, French-Constant, 2008). Las larvas de pez cebra pueden proporcionar un modelo de vertebrados in vivo de alto rendimiento para pruebas de posibles terapias de remielinización debido a su pequeño tamaño, desarrollo externo, transparencia y homología con la biología de la mielina de mamíferos. En un estudio realizado por Kim et al. (2015) se comprobó que la sulfasalazina, una droga antiinflamatoria e inmunomoduladora, promueve la remielinización en el SNC de un modelo transgénico de pez cebra desmielinizado inducido por nitroreductasa (NTR) y metrodinazol (MTZ). En este mismo trabajo, también se ha comprobado que el tratamiento con sulfasalazina redujo el número de macrófagos/microglia en el SNC de larvas de pez cebra desmielinizadas, sugiriendo que la aceleración de la remielinización fue mediada por la función inmunomoduladora de la sulfasalazina. Esto demuestra el potencial del pez cebra para proporcionar un punto de partida realista y eficaz en términos de recursos para el desarrollo de una terapia que pueda alcanzar el SNC a través de la remielinización en casos de MS.

CONCLUSIONES

La generación de nuevos modelos animales en la investigación científica o la aplicación de nuevas variaciones de los actuales modelos permiten adquirir más conocimiento sobre la MS y además investigar posibles terapias farmacológicas en esta enfermedad.

Para buscar posibles tratamientos en pacientes con la MS es necesario obtener modelos animales de investigación que manifiestan similitud genética con los seres humanos. El pez cebra presenta diferentes ventajas cuando se compara con otros modelos de investigación como por ejemplo los mamíferos roedores (ratón, rata) y lagomorfos (conejos). La buena eficacia como candidato para tests de medicamentos, respondiendo rápidamente a esos tests; la necesidad de pequeñas cantidades de compuesto para realización de los tests de medicamentos y su bajo costo hacen del “Danio rerio” un modelo interesante en la fase de selección de medicamentos contra la MS y otras enfermedades.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo en sus investigaciones con el pez cebra a FAPEMIG (Rede Mineira de Bioterismo), FUNDECC, CNPq y CAPES.

REFERENCIAS

- Chung, A.Y., Kim, P.S., Kim, S., Kim, E., Kim, D., Jeong, I., Kim, H.K., Ryu, J.H., Kim, C.H., Choi, J., Seo, J.H. (2013) Generation of demyelination models by targeted ablation of oligodendrocytes in the zebrafish CNS. *Molecules and cells*. Jul 31;36(1):82.
- Czopka, T., Lyons, D.A. (2013). Individual oligodendrocytes have only a few hours in which to generate new myelin sheaths in vivo. *Developmental cell*. Jun 24;25(6),599-609.
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.E., Courten, M., Matsoukas, J., Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*. 7 (78), 02-27.
- Engeszer, R. E. et al. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, Larchmont, 4(1), 21–40
- Files, D.K., Jausurawog, T., Katrajian, R., Danoff, R. (2015). Multiple sclerosis. *Prim care*, 42(2),159-75.
- Franklin, R. J. M. and French-Constant, C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(11), 839-855.
- Frohman, E. M., Racke, M. K., Raine, C. S. (2006) Multiple sclerosis—the plague and its pathogenesis. *New England Journal of Medicine*.354, 942–955.
- Galindo Villegas, J. (2015). Recent findings on vertebrate developmental immunity using the zebrafish model. *Molecular Immunology*, nov.
- Garg, N., Smith, T.W. (2015). An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *BrainandBehavior*, 5 (9), Sep.
- Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 358: 676–688.
- Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., Hartung, H.P. (2006). Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*. 2, 201–211.
- Jung, S.H., Kim, S., Chung, A.Y., Kim, H.T., So, J.H., Ryu, J., Park, H.C., Kim, C.H. (2010). Visualization of myelination in GFP-transgenic zebrafish. *Developmental Dynamics*. Feb 1;239(2):592-7.
- Kallaur, A.P., Lopes, J., Oliveira, S.R., Simão, A.N., Reiche, E.M., de Almeida, E.R.D., Morimoto, H.K., de Pereira, W.L., Alfieri, D.F., Borelli, S.D., et al. (2016). Immune-inflammatory and oxidative and nitrosative stress biomarkers of depression symptoms in subjects with multiple sclerosis: Increased peripheral inflammation but less acute neuroinflammation. *MolecularNeurobiology*. 53, 5191–5202.

- Kappos L., Li D., Calabresi P.A., et al. (2011). Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomized, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 378:1779-1787
- Kim, S., Lee, Y., Chang, K., Lee, D., Chun Cho, S. (2015). Promotion of remyelination by sulfasalazine in a transgenic zebrafish model of demyelination. *Molecules and cells*, 38(11), 1013.
- Kirby, B.B., Takada, N., Latimer, AJ, Shin, J, Carney, TJ, Kelsh, R.N., Appel, B. (2006). In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature neuroscience*; 9(12),1506-11.
- Kotelnikova, E., Zubizarreta, I., Pulido-Valdeolivas, I., & Villoslada, P. Systems (2017). Medicine Modeling for Multiple Sclerosis. *Current Opinion in Systems Biology*. 3, 125–131.
- Kulkarni, P., Yellanki, S., Medishetti, R., Sriram, D., Saxena, U., Yogeewari, P. (2017). Novel Zebrafish EAE model: A quick in vivo screen for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 11, 32–39.
- Luchtman, D.W., Ellwardt, E., Larochelle, C., Zipp, F. (2014). IL-17 and related cytokines involved in the pathology and immunotherapy of multiple sclerosis: current and future developments. *Cytokine&growthfactor reviews*. Aug31;25(4), 403-13.
- Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V., Bayry, J. (2012). Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *American Journal of Pathology*. 181, 8–18.
- Mangiardi, M., Crawford, D.K., Xia, X., Du, S., Simon-Freeman, R., Voskuhl, R.R., Tiwari-Woodruff, S.K. (2011). An animal model of cortical and callosal pathology in multiple sclerosis. *Brain Pathology*. 21(3), 263-78.
- Mccown, A., Sharrack, B., Ramesh, T. (2017). The characterisation of an inducible demyelination zebrafish model to aid the investigation and development of novel therapeutics in multiple sclerosis (S50.006). *Neurology*, 88(16) Supplement, p. S50.006.
- Mendes, M.F., Tilbery, C.P., Felipe, E. (2000). Fadiga e esclerose múltipla: estudo preliminar de 15 casos através de escalas de autoavaliação. *Arquivos de NeuroPsiquiatria*, São Paulo, 58 (2-B), 467-470.
- Mirshafiey, A., Jadidi-Niaragh, F. (2010). Prostaglandins in pathogenesis and treatment of multiple sclerosis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 32, 543–554.
- Palmer, M.T., Weaver, C.T. (2010). Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineage. *Nature Immunology*.; 11, 36–40.
- Pavan, K. et al. (2006). Avaliação da fadigabilidade em pacientes com esclerose múltipla através do dinamômetro manual. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, São Paulo, 64(2-A), 283-286.

- Polman, C.H. et al. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals Neurology*, 69(2), 292-302.
- Preston, M.A., Macklin, W.B. (2015). Zebrafish as a model to investigate CNS myelination. *Glia*. 63(2), 177-193.
- Pulak, R. (2015). *Tools for automating the imaging of zebrafish larvae. Methods* (San Diego, California), nov.
- Shin, J.T., Fishman, M. C. (2002). From Zebrafish to human: modular medical models. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3 (24), 311–40.
- Sospedra, M., Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annual Revue Immunology*. 23, 683–747.
- Tabarkiewicz, J., Pogoda, K., Karczmarczyk, A., Pozarowski, P., Giannopoulos, K. (2015). The role of il-17 and th17 lymphocytes in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 63, 435–449.
- Torres, M., Merino, A.G. (2017). Anti-CD20 monoclonal antibodies in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* Apr;17(4):359-371.
- Villoslada, P., Steinman, L., Baranzini, S.E. (2009). Systems biology and its application to the understanding of neurological diseases. *AnnalNeurology*, 65:124–139.
- Vogel, D.Y., Vereyken, E.J., Glim, J.E., Heijnen, P.D., Moeton, M., Van der Valk, P., Amor, S., Teunissen, C.E., Van Horssen, J., Dijkstra, C.D. (2013). Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *Journal Neuroinflamm.* 10, 35.
- Yin, W., Hu, B. (2014). Knockdown of Lingo1b protein promotes myelination and oligodendrocyte differentiation in zebrafish. *Experimental neurology*. 251, 72-83.