

REVISIÓN

Modelos experimentales de desmielinización-remielinización



L. Torre-Fuentes*, L. Moreno-Jiménez, V. Pytel, J.A. Matías-Guiu, U. Gómez-Pinedo y J. Matías-Guiu

Servicio de Neurología, Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

Recibido el 5 de julio de 2017; aceptado el 6 de julio de 2017

PALABRAS CLAVE

Modelos experimentales;
Desmielinización;
Remielinización;
Esclerosis múltiple;
Encefalitis alérgica experimental;
Mielina

Resumen

Introducción: El uso de modelos experimentales en animales permite aumentar el conocimiento sobre la patología del sistema nervioso central. Sin embargo, en la esclerosis múltiple, no existe un modelo que permita una visión general de la enfermedad, de forma que es necesario utilizar una variedad de modelos que abarquen los distintos cambios que se producen.

Desarrollo: Se revisan los distintos modelos experimentales que pueden ser utilizados en la investigación en la esclerosis múltiple, tanto *in vitro* como *in vivo*. En relación a los modelos *in vitro* se analizan los distintos cultivos celulares y sus potenciales modificaciones así como los modelos en rodajas. En los modelos *in vivo*, se analizan los modelos de base inmune-inflamatoria como la encefalitis alérgica experimental en los distintos animales, además de las enfermedades desmielinizantes por virus. Por otro lado, se analizan los modelos de desmielinización-remielinización incluyéndose las lesiones químicas por cuprizona, lisolecitina, bromuro de etidio, así como el modelo de zebrafish y los modelos transgénicos.

Conclusiones: Los modelos experimentales nos permiten acercarnos al conocimiento de los diversos mecanismos que ocurren en la esclerosis múltiple. La utilización de cada uno de ellos depende de los objetivos de investigación que planteen.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Experimental models;
Demyelination;
Remyelination;
Multiple sclerosis;

Experimental models of demyelination and remyelination

Abstract

Introduction: Experimental animal models constitute a useful tool to deepen our knowledge of central nervous system disorders. In the case of multiple sclerosis, however, there is no such specific model able to provide an overview of the disease; multiple models covering the different pathophysiological features of the disease are therefore necessary.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: lauratorref@gmail.com (L. Torre-Fuentes).

Experimental allergic encephalitis;
Myelin

Development: We reviewed the different *in vitro* and *in vivo* experimental models used in multiple sclerosis research. Concerning *in vitro* models, we analysed cell cultures and slice models. As for *in vivo* models, we examined such models of autoimmunity and inflammation as experimental allergic encephalitis in different animals and virus-induced demyelinating diseases. Furthermore, we analysed models of demyelination and remyelination, including chemical lesions caused by cuprizone, lysolecithin, and ethidium bromide; zebrafish; and transgenic models.

Conclusions: Experimental models provide a deeper understanding of the different pathogenic mechanisms involved in multiple sclerosis. Choosing one model or another depends on the specific aims of the study.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

El desarrollo de modelos experimentales es un elemento esencial para avanzar en el conocimiento de las enfermedades y en la búsqueda de terapias específicas y efectivas. Esta necesidad se ve dificultada en la esclerosis múltiple (EM) por el hecho de que esta enfermedad solo aparece en el ser humano y que las enfermedades desmielinizantes en animales muestran diferencias importantes sobre cualquier enfermedad humana que comprometa el sistema nervioso central (SNC)¹⁻³. Así, la búsqueda de modelos animales para las enfermedades desmielinizantes ha conducido a modelos *in vitro* e *in vivo*, siendo estos últimos inducidos con lesiones químicas, virales o inmunes, además de los animales transgénicos^{1,4-6}. Al no disponer de un modelo equiparable a la EM, la información debe obtenerse de varios de ellos, de forma que el conocimiento de los mecanismos de los distintos modelos existentes permite una aproximación de lo que ocurre en esta enfermedad⁷.

Aunque la EM es una enfermedad inflamatoria en el origen, la falta de reparación en las lesiones, la remielinización incompleta y la neurodegeneración, son los factores que conducen a la progresión y a la discapacidad. Este aspecto es relevante en el tratamiento de los pacientes con EM, ya que la actual terapéutica solo es efectiva en el control de los mecanismos inmunes y en consecuencia en las fases iniciales de la enfermedad, pero no tienen acción en la remielinización y por lo tanto tampoco en la aparición de secuelas^{8,9}. Es por ello, que la remielinización es el objetivo de nuevas opciones terapéuticas en la EM¹⁰ y en esta revisión abordaremos los modelos disponibles que nos permiten disponer de información sobre esa fase de la enfermedad y que permiten establecer diseños de evaluación de fármacos.

Desarrollo

Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* consisten en cultivos celulares de células aisladas del cerebro de mamíferos o de líneas de células inmortalizadas que permiten estudiar las interacciones entre sus células. Estas líneas celulares pueden ser

transformadas genéticamente, las cuales son estables y pueden ser sometidas a diversas condiciones experimentales^{6,11}. En el SNC, pueden utilizarse cultivos celulares de microglía (mesodérmica), neuronas, astrocitos y oligodendrocitos además de sus precursores (ectodérmicas). En la EM, los cultivos de células de la microglía permiten extrapolar su papel en la respuesta inmune en el SNC, analizando su respuesta ante diversas señales, como por ejemplo las bioquímicas, y analizando los potenciales mecanismos de activación de estas células^{6,12,13}. Los cultivos de células de linajes ectodérmicos permiten evaluar la cascada de eventos posteriores a la desmielinización, el soporte metabólico en zonas de lesión por parte de los astrocitos, las vías de activación y señalización involucradas en el reemplazo de oligodendrocitos y remielinización de axones afectados. Es especialmente interesante la utilización de cultivos de células precursoras de oligodendrocitos o de células neurales indiferenciadas, ya que nos permiten evaluar los procesos de diferenciación, observar el efecto de factores inflamatorios, testar nuevos compuestos químicos destinados a favorecer la proliferación de los oligodendrocitos⁶, así como desarrollar estrategias que ayuden a mejorar el proceso de remielinización¹⁴. Nuestro grupo ha utilizado estas células para transfectar mutaciones asociadas a la enfermedad de Alexander y conocer los mecanismos de la mielinización en esta enfermedad¹⁵. Los cultivos primarios de astrocitos son también interesantes ya que estas células participan en el ambiente local, el cual es imprescindible en el proceso de remielinización, actuando mediante la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas o el factor de crecimiento insulínico tipo 1, los cuales han mostrado que promueven la remielinización. La principal desventaja de estos modelos *in vitro* es que la respuesta de los tipos celulares individuales no tiene por qué reflejar totalmente lo que ocurre en el tejido. Los cultivos de rodajas son modelos *in vitro* que permiten estudiar las interacciones célula-célula¹⁴ y acercarse más a las condiciones *in vivo*¹⁶, así como observar la interacción del sistema inmune con los mecanismos del daño y reparación del SNC¹, permitiendo regular las alteraciones en la maduración de los oligodendrocitos y el fallo de la remielinización relacionada a una astrogliosis crónica del SNC⁵. Los modelos en rodajas presentan ciertas limitaciones, como el procedimiento de obtención de las rodajas, ya que se requieren muestras de 200 a 500 micras de espesor

procedentes de animales jóvenes o incluso neonatales, que deben manipularse en laboratorios con condiciones especiales para gas carbónico^{17,18}.

Modelos *in vivo*

Los modelos experimentales *in vivo* aplicables al conocimiento en la EM pueden clasificarse en tres bloques: 1) modelos autoinmunes y/o inflamatorios (fig. 1A), como la encefalitis alérgica experimental (EAE) y aquellos desencadenados por virus; 2) modelos de desmielinización-remielinización (fig. 1B), incluyéndose las lesiones químicas por cuprizona, lisolecitina, bromuro de etidio, así como el modelo de zebrafish; 3) los modelos transgénicos, los cuales se intentan acercar de manera más similar a la enfermedad¹⁴ (tabla 1).

Modelos autoinmunes y/o inflamatorios

La encefalitis alérgica experimental

La EAE es una aproximación a las características de la EM: inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis. La principal diferencia entre la EM y la EAE es que en esta última se requiere una inmunización externa para desarrollarse^{3,19}. Existen diferentes protocolos para inducir la enfermedad pero los más utilizados se basan en la inmunización del animal con un autoantígeno para inducir la activación de sus células T reactivas (EAE activa) o bien en la transferencia de células T autorreactivas a un animal *naïve* (EAE pasiva)^{6,20}. Para provocar la EAE de manera activa se necesita un adyuvante, siendo el más utilizado el *Complete Freund's Adjuvant*²¹, el cual produce una lenta liberación del antígeno procedente del inóculo² además de utilizar alguna especie de micobacteria, normalmente *Bordetella pertussis*, la cual provoca una expansión clonal de linfocitos T autorreactivos⁶, potenciando de esta manera las manifestaciones típicas de EM al favorecer la respuesta inmune humoral²². Aunque la EAE ha sido utilizada para estudiar los mecanismos relacionados con la neuroinflamación y la respuesta inmune, también ha sido utilizada para el estudio de los procesos de desmielinización y remielinización¹⁹. Al igual que en la EM, la edad, el género y los factores ambientales tienen una profunda influencia en la susceptibilidad, severidad y curso de la EAE¹⁴. Este modelo ha sido testado en diferentes especies con el fin de encontrar aquel que mejor mimetice a la enfermedad en humanos. Así, se han ensayado en primates, como los monos *Rhesus*, que mostraron parálisis asociada a infiltrados perivasculariales y desmielinización en el cerebro y la médula espinal, así como encefalomielitis diseminada²³⁻²⁵. En este caso se desarrollan síntomas clínicos severos hiperagudos, de forma que es un modelo que se acerca más a la variante Marburg. El *Marmoset* es otra especie a la que se ha inducido la EAE con diferentes procedimientos: a) por medio de un homogenado de materia blanca provocando lesiones que se parecen a las observadas en las autopsias de pacientes²⁶, b) mediante la administración de glicoproteína oligodendroglial de la mielina (MOG) recombinante humana provocando lesiones desmielinizantes más

pequeñas pero más duraderas^{26,27} o c) mediante la inmunización con una dosis subclínica de MOG recombinante de rata seguido de una inyección de TNF α e interferón^{27,28}. Aunque la EAE en primates se asemeja más a la enfermedad en humanos que la de los roedores en relación con los cambios patológicos, existen limitaciones tanto éticas como de coste para su uso, cuando es posible utilizar animales menores²⁷.

Los roedores presentan amplias diferencias con los humanos en cuanto a su sistema inmune pero permiten evaluar el carácter crónico y progresivo de la enfermedad a través de estudios inmunogenéticos, histopatológicos y terapéuticos. En el ratón la EAE es inducida mediante la respuesta inmunológica causada tras la inyección de los antígenos de mielina, como el péptido de la proteína proteolípídica (PLP), la MOG²⁹ y la proteína básica de la mielina (MBP), observándose en estos dos últimos activación de microglía, infiltración perivascular de linfocitos T y B e incluso en algunos casos, se observa daño en la mielina que tiende a correlacionar con los periodos de recaída de la enfermedad³⁰. A su vez, también se han desarrollado modelos en ratón para la neuromielitis óptica^{31,32}. En el modelo de EAE en rata, la enfermedad consiste en la infiltración inflamatoria de las células mononucleares en la médula espinal, cerebelo y bulbo raquídeo³³. Asimismo, existen dos modelos de EAE con *Guinea pigs* (Hartley y línea 13) en las cuales se han desarrollado estudios tras la inducción de EAE. Se ha considerado que la línea 13 podría suponer uno de los modelos que mimeticen mejor la desmielinización producida en la EM, ya que desarrolla una sintomatología caracterizada por recaídas crónicas³⁴. Además existe un modelo de EAE sobre el zebrafish³⁵.

Modelos de enfermedades desmielinizantes virales

Existen modelos que se basan en la utilización de virus para inducir desmielinización en el SNC. El *Theiler's murine encephalomyelitis virus* es un patógeno exclusivo de ratones^{36,37} capaz de inducir en estos una enfermedad neurológica desmielinizante por infección de las neuronas, la cual se manifiesta como una encefalitis normalmente subclínica. Tras este primer estadio agudo le sigue una fase crónico-progresiva caracterizada por procesos de desmielinización-remielinización que afecta principalmente a la médula espinal y donde se puede apreciar daño en los macrófagos, microglía, oligodendrocitos y astrocitos^{2,37-39}. Las lesiones en la médula espinal están caracterizadas por una inflamación crónica, la formación de placas confluentes de la primera desmielinización, una extensión variable del daño axonal y remielinización. La desmielinización activa ocurre en sitios donde la microglía está activada y hay infiltración de macrófagos, es decir, que estas lesiones comparten características esenciales con las presentes en EM².

La cepa no virulenta A7 del *Semliki Forest Virus* es otro virus neuroinvasivo que, tras ser inoculado periféricamente en ratones susceptibles, induce daño en la mielina del SNC. Esta cepa induce viremia, que dura 3-4 días, tras la cual el virus se elimina de la sangre. En las siguientes infecciones este virus es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica infectando neuronas y oligodendrocitos, donde la replicación viral tiene su máximo a los 5-7 días, mientras que la desmielinización se observa entre los 13 y los 17 días. Se sabe que el daño en la mielina depende de la cepa del virus,

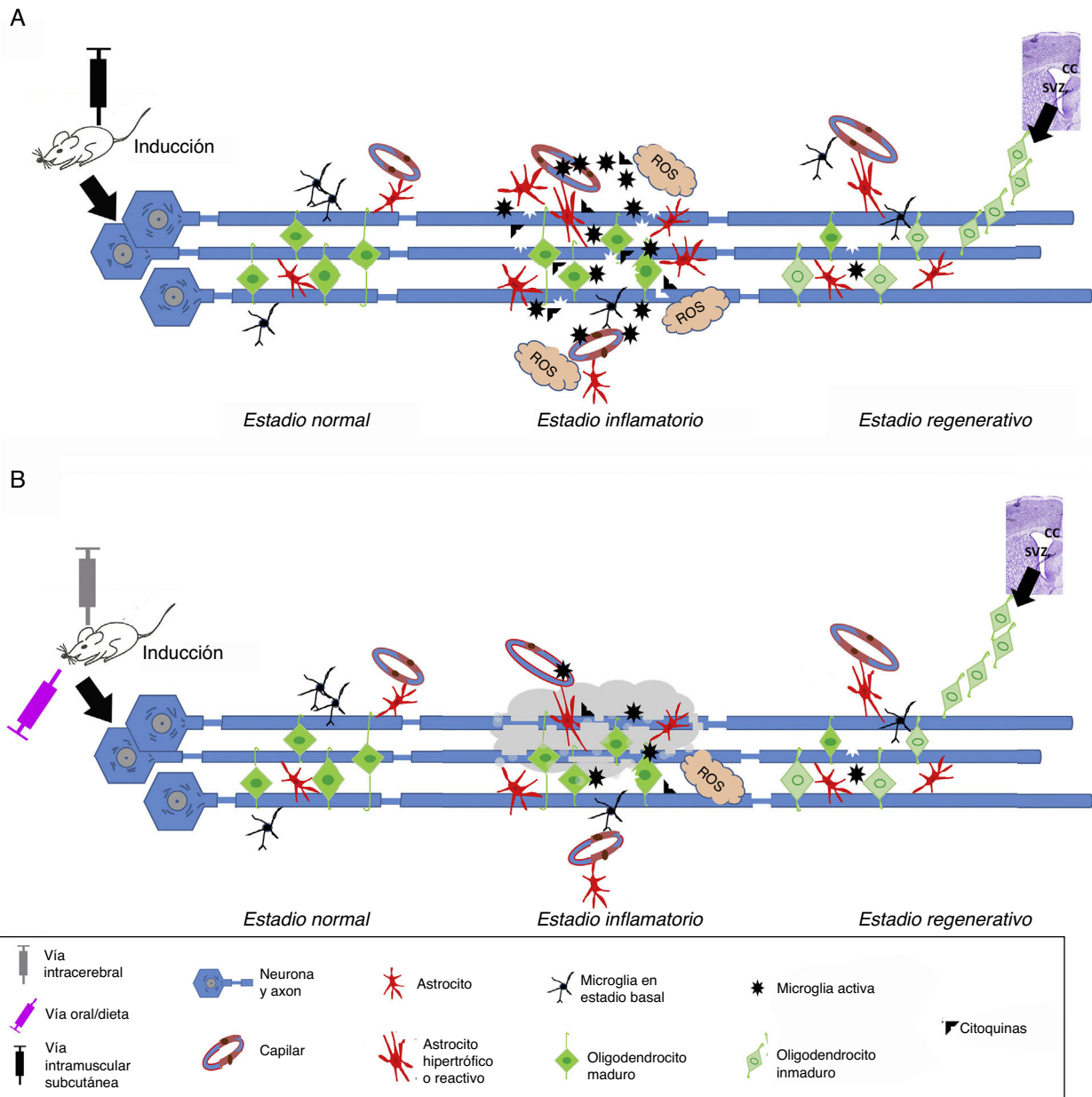


Figura 1 Esquema de inducción en los modelos *in vivo*. A) Inducción en los modelos autoinmunes y/o inflamatorios. La inducción se realiza por la aplicación del agente inmunoestimulante por vía intramuscular o subcutánea. Una vez iniciado el estadio inflamatorio, se observa un incremento de los niveles de citoquinas proinflamatorias, linfocitos T y microglía activada, provocando a su vez generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño en los oligodendrocitos y la mielina, además de provocar una gliosis reactiva y alteración de la pared capilar, generando edema. Transcurrido este estadio, en el proceso regenerativo la cantidad de células activadas (astrocitos y microglía) disminuyen y se observa una migración de progenitores oligodendrogiales, principalmente desde el cuerpo caloso (CC) o la zona subventricular (SVZ), para sustituir las células afectadas e iniciar la remielinización. B) Inducción en los modelos de desmielinización. La inducción se realiza por la aplicación de un agente químico o tóxico por varias vías: oral (dieta), local (intracerebral), intramuscular o subcutánea. Una vez administrado y ya en torrente sanguíneo, el agente tóxico en contacto con los axones produce degeneración mielínica, provocando un microambiente que de forma secundaria induce la activación de células de microglía, generación de ROS, así como la liberación de citoquinas inflamatorias y gliosis reactiva, teniendo como punto final la pérdida de las vainas de mielina y de las células generadoras de mielina (oligodendrocitos). Transcurrido este estadio, en el proceso regenerativo la cantidad de células activadas (astrocitos y microglía) disminuyen y se observa una migración de progenitores oligodendrogiales, principalmente desde el CC o la SVZ, para sustituir las células afectadas e iniciar la remielinización.

Tabla 1 Características principales de los diferentes modelos *in vivo*, ventajas y desventajas

Modelo	Especie	Agente químico	Remielinización espontánea	Ventajas	Desventajas
EAE	Rata Ratón <i>Guinea Pig</i> <i>Zebrafish</i> Macaco Rhesus Marmoset	MOG MBP PLP	No	–Patología remitente-recurrente similar a EM	–No sirve para estudiar la remielinización
TMEV	Ratón	<i>Theiler Murine Encephalomyelitis Virus</i>	No	–Válido para testar estrategias terapéuticas específicas del modelo viral de EM	–Difícil determinar qué proporción está causada por la actividad del virus o por la respuesta inflamatoria
SFV	Ratón	<i>Semliki Forest Virus</i>	Sí	–Válido para examinar mecanismos de desmielinización-remielinización inducidos viralmente -Los ratones no sucumben a la enfermedad neurológica	–Depende del sistema inmune del animal
JME	Macaco japonés	<i>Simian herpesvirus</i>	Limitada	–Espontáneo	–No existe modelo experimental
MHV	Ratón	<i>Mouse Hepatitis (corona) Virus</i>	Sí	–Buen modelo para imitar el posible desencadenamiento natural de la EM -Mejor modelo que la EAE para estudiar la discapacidad progresiva	-No está claro cómo el virus infecta y se expande en el SNC del animal
Lisolecitina	Rata	Lisolecitina	Sí	–Lesión localizada	–Técnica muy compleja
Cuprizona	Ratón Rata Ratón	Cuprizona	Sí	–Tiempo preciso de desmielinización-remielinización –No inflamatoria –Específica de oligodendrocitos	–No válido para el estudio de características funcionales de algunas cepas
Bromuro de etidio	Rata	BrEt	Sí	–Lesión localizada	–Técnica compleja

BrEt: bromuro de etidio; EAE: encefalitis alérgica experimental; JME: *Japanese macaque encephalomyelitis*; MBP: proteína básica de la mielina; MHV: *Mouse Hepatitis (corona) virus*; MOG: glicoproteína oligodendroglial de la mielina; PLP: péptido de la proteína proteolípica; SFV: *Semliki forest Virus*; TMEV: *Theiler's murine encephalomyelitis virus*.

la edad del portador y del desarrollo del sistema inmune del animal²⁰.

El *Japanese Macaque Encephalomyelitis* (JME) es una enfermedad desmielinizante asociada a un herpesvirus de simios. JME normalmente aparece en animales adultos jóvenes, y no muestra preferencias por género. Patológicamente, causa áreas multifocales de desmielinización con pérdida de oligodendrocitos y pérdida axonal variable en la materia blanca del cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo y médula espinal asociada con infiltrados de macrófagos y

linfocitos. Tiene similitudes clínicas, de resonancia magnética y patológicas con la EM, aunque también presenta ciertas diferencias como son la cantidad de neutrófilos y linfocitos en LCR, así como necrosis y hemorragias como parte de la patología. Las lesiones observadas en estos animales son tanto agudas como crónicas^{40,41}.

El *Mouse Hepatitis (corona) virus* es un virus que puede inducir diversas enfermedades dependiendo de la cepa. La enfermedad neurológica se produce después de una infección intracraneal o nasal con una cepa neurovirulenta. Esta

enfermedad se desarrolla en dos fases, la primera de ellas comienza días después de la infección y resulta en una panencefalitis inducida por virus. Tras esta fase los animales se recuperan y pasadas 4 semanas puede comenzar la segunda fase, la cual está caracterizada por una enfermedad neurológica con lesiones inflamatorias desmielinizantes. El virus es eliminado del cerebro al final de la primera fase pero los RNA virales permanecen en los tejidos durante toda la enfermedad^{6,42}.

Una diferencia relevante entre los modelos virales y los modelos EAE es que la desmielinización inflamatoria crónica inducida por virus está asociada a una activación muy importante de la microglía⁶.

Modelos de desmielinización-remielinización

Modelos químicos de lesión

Los agentes más utilizados en estos modelos son cuprizona, lisolecitina y bromuro de etidio. Todos ellos son capaces de producir una desmielinización focal tras su administración⁶. Aún así, los dos primeros son los más utilizados debido a su capacidad de inducir una desmielinización extensa en ciertos lugares del SNC como el cuerpo estriado, el hipocampo, la médula espinal o el nervio óptico, entre otros^{6,43}. La cuprizona es un agente quelante ampliamente utilizado debido a que es capaz de inducir desmielinización en el SNC tras su administración sistémica⁴⁴. Se ha observado que provoca el desarrollo de lesiones desmielinizantes agudas que pueden evolucionar a un proceso crónico mientras persista su administración. Este modelo tiene la ventaja de que, una vez suprimida la administración, se desencadena un proceso espontáneo de remielinización permitiendo el estudio de ambos mecanismos. Otra de las grandes ventajas es que el compuesto provoca una supresión de células T permitiendo observar los procesos de desmielinización y remielinización, separando los efectos inducidos por la activación del sistema inmune de aquellos debidos al fármaco suministrado⁶. La lisolecitina, inyectada en la sustancia blanca, induce placas focales de desmielinización debido a la acción directa de la toxina, la cual daña la vaina de mielina^{2,45}. Además es un agente quimioatrayente para monocitos permitiendo que se desencadene una respuesta inflamatoria, pudiendo observarse sus efectos utilizando diferentes animales de experimentación como gatos y conejos, además de ratas y ratones⁴⁶. Al igual que en otros modelos tóxicos de desmielinización, la fase de destrucción de la mielina es rápidamente seguida de una remielinización, aunque la velocidad y el grado de remielinización son dependientes de la edad². Por su parte, el efecto tóxico del bromuro de etidio se basa en su interacción con el DNA, afectando principalmente a los astrocitos, por lo que las lesiones producidas son inducidas por la ausencia de factores de soporte liberados por estas células. Con este modelo se ha observado que la remielinización mediada por oligodendrocitos requiere la presencia de astrocitos^{2,47}.

Modelo de mielinización del *zebrafish*

El *zebrafish* es un animal de pequeño tamaño, con relativa simplicidad, transparencia óptica en estado embrionario, y cuyo desarrollo embrionario es rápido⁴⁸, permitiendo observar los axones mielinizados a partir del tercer día, y así

analizar los procesos de mielinización y reparación *in vivo* y en tiempo real⁴⁹. Además, estos animales alcanzan la madurez sexual de forma muy temprana, son capaces de producir numerosas crías y su mantenimiento es mucho menos costoso que el de otros animales de experimentación. Asimismo, permite la generación de animales transgénicos que expresan proteína verde fluorescente^{50,51} en OL y OPC, lo que permite analizar la remielinización^{52,53} y testar tratamientos que la promuevan⁵⁴.

Modelos con animales transgénicos

Los ratones transgénicos en los cuales los genes que codifican para los componentes inmunes se han eliminado o insertado, permiten extrapolar el papel de determinados factores en la patogénesis del daño de SNC. En algunos modelos *knockout* para proteínas mielínicas se han conseguido reproducir alteraciones relacionadas con la EM⁵. Asimismo, se han realizado modelos para estudiar la mielinización basados en diferentes ratones mutados donde la mielina se encuentra afectada, como los ratones *Shiverer* (donde el gen que codifica para MBP está duplicado e invertido), ratón *Rumpshaker* (donde el gen que codifica para la PLP está mutado) y ratones *Jimpy* (con una mutación puntual en el gen que codifica para PLP) que desarrollan desmielinización⁶.

Conclusiones

No existe un modelo único que permita comprender los múltiples factores que pueden intervenir en el desarrollo de la EM y en cada una de sus fases, y por ello los investigadores tratan de acercarse a la enfermedad en aspectos y recursos que pueden ser muy diferentes. La generación de nuevos modelos o la aplicación de nuevas variaciones a los modelos actuales permitirá conocer lo que la enfermedad representa y cómo puede abordarse en terapéutica. Asimismo, los distintos modelos nos permiten extrapolar la respuesta terapéutica a determinadas opciones de tratamiento. La obtención de modelos que se acerquen cada vez más a lo que sucede en la EM, es la primera fase en la búsqueda de los mejores tratamientos para estos pacientes, pero probablemente, el conocimiento obtenido de todos ellos, es lo que realmente nos permitirá entenderla.

En relación a la búsqueda de acciones sobre la desmielinización-remielinización, es indudable el papel de los modelos químicos, aunque no nos permiten una aplicabilidad a lo que realmente representa la enfermedad, de forma que es necesario incorporar otros diseños en función de los objetivos de cada investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Pachner AR. Experimental models of multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2011;24:291–9.

2. Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* 2017;133:223–44.
3. Ben-nun A, Kaushanky N, Kawakami N, Krishnamoorthy G, Berer K, Liblau R, et al. From classic to spontaneous and humanized models of multiple sclerosis: Impact on understanding pathogenesis and drug development. *J Autoimmun.* 2014;54:33–50.
4. Zhang H, Jarjour AA, Boyd A, Williams A. Central nervous system remyelination in culture—a tool for multiple sclerosis research. *Exp Neurol.* 2011;230:138–48.
5. Baker D, Jackson SJ. Model of multiple sclerosis. *ACNR.* 2007;6:10–2.
6. Van der Star BJ, Vogel DY, Kipp M, Puentes F, Baker D, Amor S. In vitro and in vivo models of multiple sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012;11:570–88.
7. Osorio-Querejeta I, Sáenz-Cuesta M, Muñoz-Culla M, Otaegui D. Models for studying myelination, demyelination and remyelination. *Neuromolecular Med.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1007/s12017-017-8442-1>.
8. Duddy M, Haghikia A, Cocco E, Eggers C, Drulovic J, Carmona O, et al. Managing MS in a changing treatment landscape. *J Neurol.* 2011;258:728–39.
9. Nakahara J, Maeda M, Aiso S, Suzuki N. Current concepts in multiple sclerosis: Autoimmunity versus oligodendroglialopathy. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42:26–34.
10. Matias-Guiu J, Gomez-Pinedo U, Matias-Guiu JA. News in multiple sclerosis: Remyelination as a therapeutic target. *Med Clin (Barc).* 2017;148:377–80.
11. Gibbons HM, Dragunow M. Adult human brain cell culture for neuroscience research. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42:844–56.
12. Majed HH, Chandran S, Niclou SP, Nicholas RS, Wilkins A, Wing MG, et al. A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia. *J Neurosci.* 2006;26:1730–8.
13. Peng W. Neuroprotective effects of G-CSF administration in microglia-mediated reactive T cell activation in vitro. *Immunol Res.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-017-8928-9>.
14. Kipp M, van der Star B, Vogel D, Puentes F, van der Valk P, Baker D, et al. Experimental in vivo and in vitro models of multiple sclerosis: EAE and beyond. *Mult Scler Relat Disord.* 2012;1:15–28.
15. Gómez-Pinedo U, Sirerol-Piquer MS, Durán-Moreno M, García-Verdugo JM, Matias-Guiu J. Alexander disease mutations produce cells with coexpression of glial fibrillary acidic protein and NG2 in neurosphere cultures and inhibit differentiation into mature oligodendrocytes. *Front Neurol.* 2017;8:255.
16. Madill M, Fitzgerald D, O'Connell K, Dev K, Shen S, FitzGerald U. In vitro and ex vivo models of multiple sclerosis. *Drug Discov Today.* 2016;21:1504–11.
17. Hurtado de Mendoza T, Balana B, Slesinger PA, Verma IM. Organotypic cerebellar cultures: apoptotic challenges and detection. *J Vis Exp.* 2011;51:2564, <http://dx.doi.org/10.3791/2564>.
18. Rambani K, Vukasinovic J, Glezer A, Potter SM. Culturing thick brain slices: an interstitial 3D microperfusion system for enhanced viability. *J Neurosci Methods.* 2009;180:243–54.
19. Constantinescu C, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 2011;164:1079–106.
20. Baker D, Amor S. Mouse models of multiple sclerosis: Lost in translation? *Curr Pharm Des.* 2015;21:2440–52.
21. Haanstra K, Jagessar S, Bauchet A, Doussau M, Fovet C, Heijmans N, et al. Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis with recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein in incomplete Freund's adjuvant in three non-human primate species. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013;8:1251–64.
22. Mahfouz MM, Abdelsalam RM, Masoud MA, Mansour HA, Ahmed-Farid OA, Kenawy SA. The neuroprotective effect of mesenchymal stem cells on an experimentally induced model for multiple sclerosis in mice. *J Biochem Mol Toxicol.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.21936>.
23. Procaccini C, de Rosa V, Pucino V, Formisano L, Matarese G. Animal models of multiple sclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;759:181–91.
24. Haanstra KG, Dijkman K, Bashir N, Bauer J, Mary C, Poirier N, et al. Selective blockade of CD28-mediated T cell costimulation protects rhesus monkeys against acute fatal experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2015;194:1454–66.
25. Stimmer L, Fovet C, Serguera C. Experimental models of autoimmune demyelinating diseases in nonhuman primates. *Vet Pathol.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1177/0300985817712794>.
26. Maggi P, Sati P, Massacesi L. Magnetic resonance imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset. *J Neuroimmunol.* 2017;304:86–92.
27. Kap Y, Jagessar A, Dunham J, Hart B. The common marmoset as an indispensable animal model for immunotherapy development in multiple sclerosis. *Drug Discov Today.* 2016;26:1200–5.
28. Starssart E, Helms G, Gareia-Rodríguez E, Nessler S, Hayardeny L, Wegner C, et al. A new targeted model of experimental autoimmune encephalomyelitis in the common marmoset. *Brain Pathol.* 2015;26:452–64.
29. Alberti TB, Barbosa WL, Vieira JL, Raposo NR, Dutra RC. (-)- β -Caryophyllene, a CB2 Receptor-Selective Phytocannabinoid, Suppresses Motor Paralysis and Neuroinflammation in a Murine Model of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2017, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18040691>.
30. Amor S, Smith PA, Hart B, Baker D. Biozzi mice: of mice and human neurological diseases. *J Neuroimmunol.* 2005;165:1–10.
31. Bradl M, Misu T, Takahashi T, Watanabe M, Mader S, Reindl M, et al. Neuromyelitis optica: pathogenicity of patient immunoglobulin *in vivo*. *Ann Neurol.* 2009;66:630–43.
32. Yao X, Su T, Verkman AS. Clobetasol promotes remyelination in a mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol Commun.* 2016;4:42.
33. Robinson A, Harp C, Noronha A, Miller S. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:173–89.
34. Gambi D, di Cesare N, di Trapani G, Macchi G, Sbriccoli A. Experimental allergic encephalomyelitis in guinea pig: variability of response to intradermal emulsion injection. *Ital J Neurol Sci.* 1989;10:33–41.
35. Kulkarni P, Yellanki S, Medishetti R, Sriram D, Saxena U, Yogeewari P. Novel Zebrafish EAE model: A quick in vivo screen for multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2017;11:32–9.
36. Owens T. Animal models for multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 2006;98:77–89.
37. McCarthy DP, Richards MH, Miller SD. Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol.* 2012;900:381–401.
38. Tsunoda I, Tanaka T, Terry EJ, Fujinami RS. Contrasting roles for axonal degeneration in an autoimmune versus viral model of multiple sclerosis: When can axonal injury be beneficial? *Am J Pathol.* 2007;170:214–26.
39. DePaula-Silva AB, Hanak TJ, Libbey JE, Fujinami RS. Theiler's murine encephalomyelitis virus infection of SJL/J and C57BL/6 J mice: Models for multiple sclerosis and epilepsy. *J Neuroimmunol.* 2017;308:30–42.
40. Axthelm M, Bourdette D, Marracci G, Su W, Mullaney E, Manoharan M, et al. Japanese macaque encephalomyelitis: a spontaneous multiple sclerosis-like disease in a nonhuman primate. *Ann Neurol.* 2011;70:362–73.
41. Blair TC, Manoharan M, Rawlings-Rhea SD, Tagge I, Kohama SG, Hollister-Smith J, et al. Immunopathology of Japanese macaque

- encephalomyelitis is similar to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2016;291:1–10.
42. Bender S, Weiss S. Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010;5:336–54.
 43. Woodruff RH, Franklin RJ. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin, ethidium bromide, and complement/antigalactocerebroside: a comparative study. *Glia.* 1999;25:216–28.
 44. Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2014;47:485–505.
 45. Blakemore WF, Franklin RJ. Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008;318:193–212.
 46. Jeffery N, Blakemore W. Remyelination of mouse spinal cord axons demyelinated by local injection of lysolecithin. *J Neurocytol.* 1995;24:775–81.
 47. Merrill J. In vitro and in vivo pharmacological models to assess demyelination and remyelination. *Neuropsychopharmacology.* 2009;34:55–73.
 48. Preston MA, Macklin WB. Zebrafish as a model to investigate CNS myelination. *Glia.* 2015;63:177–93.
 49. Ackerman SD, Monk KR. The scales and tales of myelination: using zebrafish and mouse to study myelinating glia. *Brain Res.* 2016;1641:79–91.
 50. Gong Z, Ju B, Wan H. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica.* 2001;111:213–25.
 51. Dubińska-Magiera M, Daczewska M, Lewicka A, Migocka-Patrzałek M, Niedbalska-Tarnowska J, Jagla K. Zebrafish: a model for the study of toxicants affecting muscle development and function. *Int J Mol Sci.* 2016, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17111941>.
 52. Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, et al. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci.* 2006;9:1506–11.
 53. Udvardia AJ, Linney E. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol.* 2003;256:1–17.
 54. Buckley CE, Goldsmith P, Franklin RJ. Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination? *Dis Model Mech.* 2008;1:221–8.