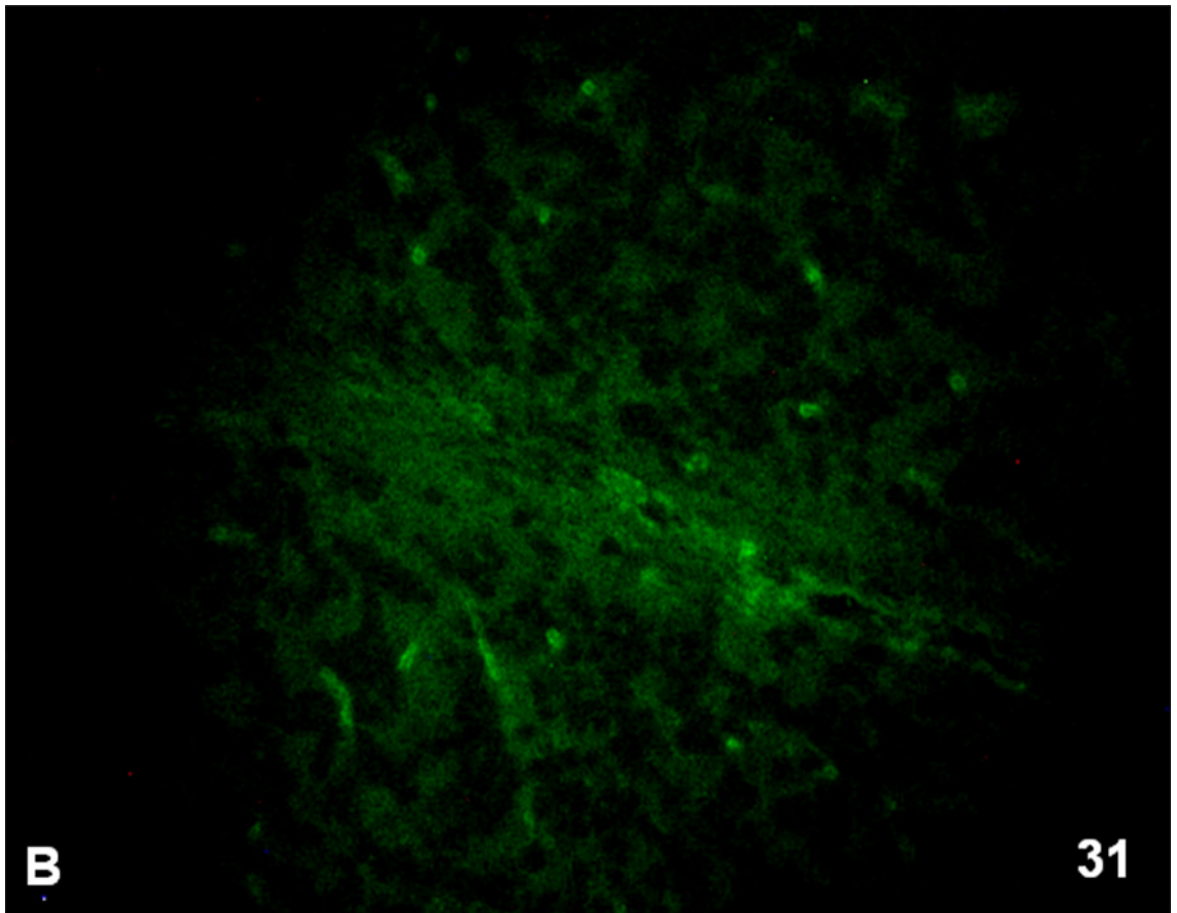
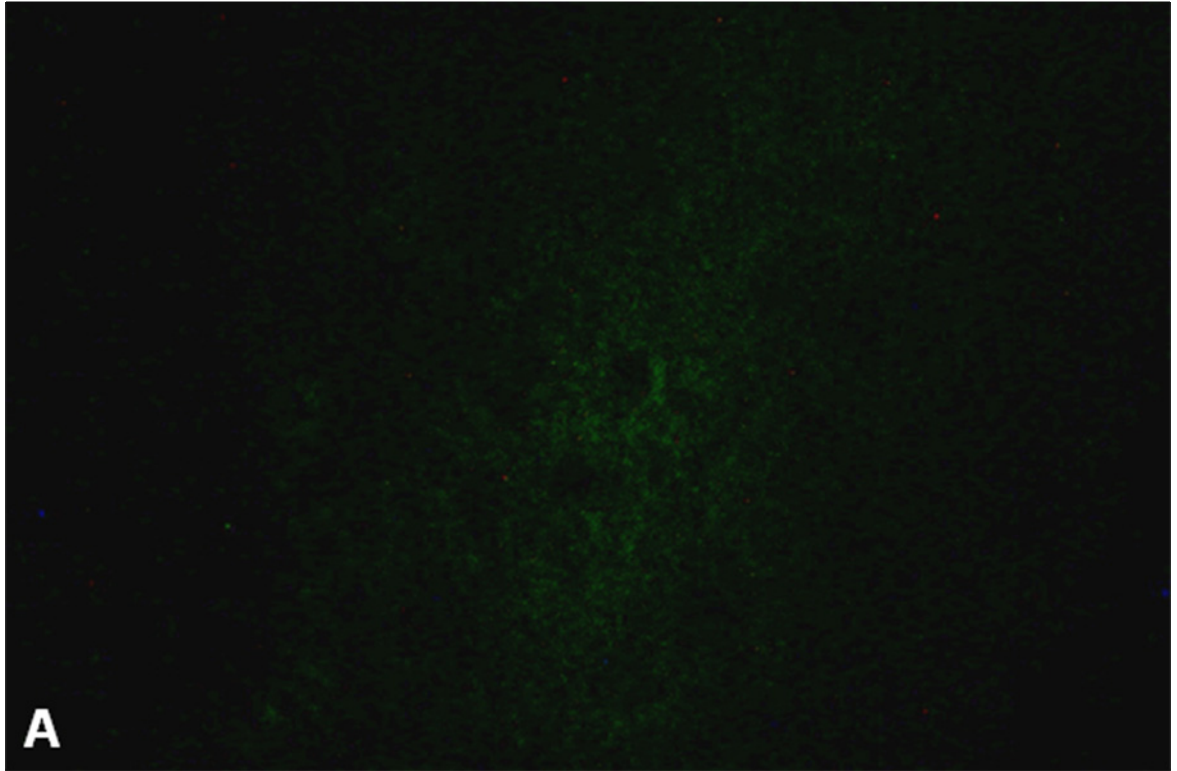
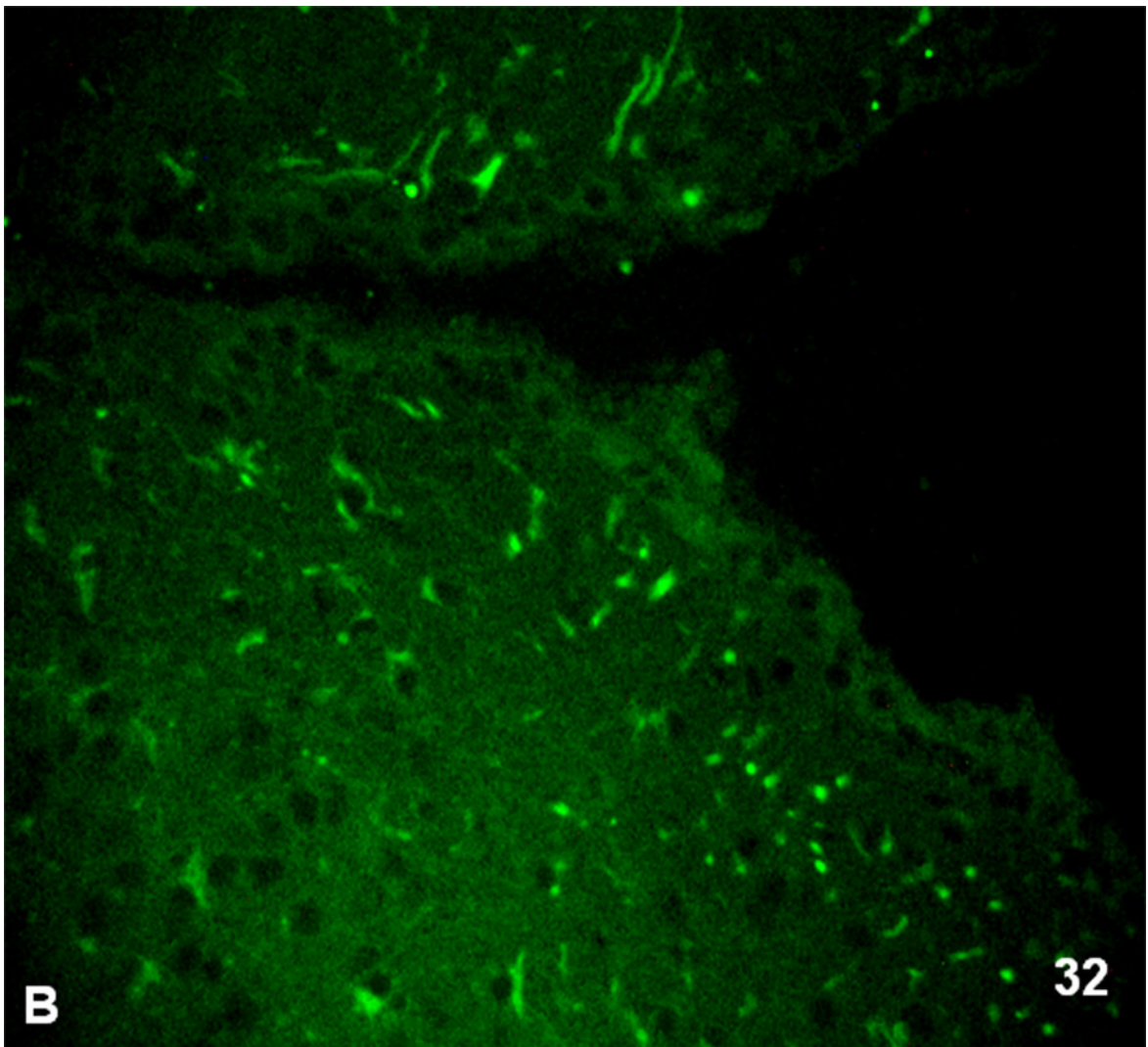
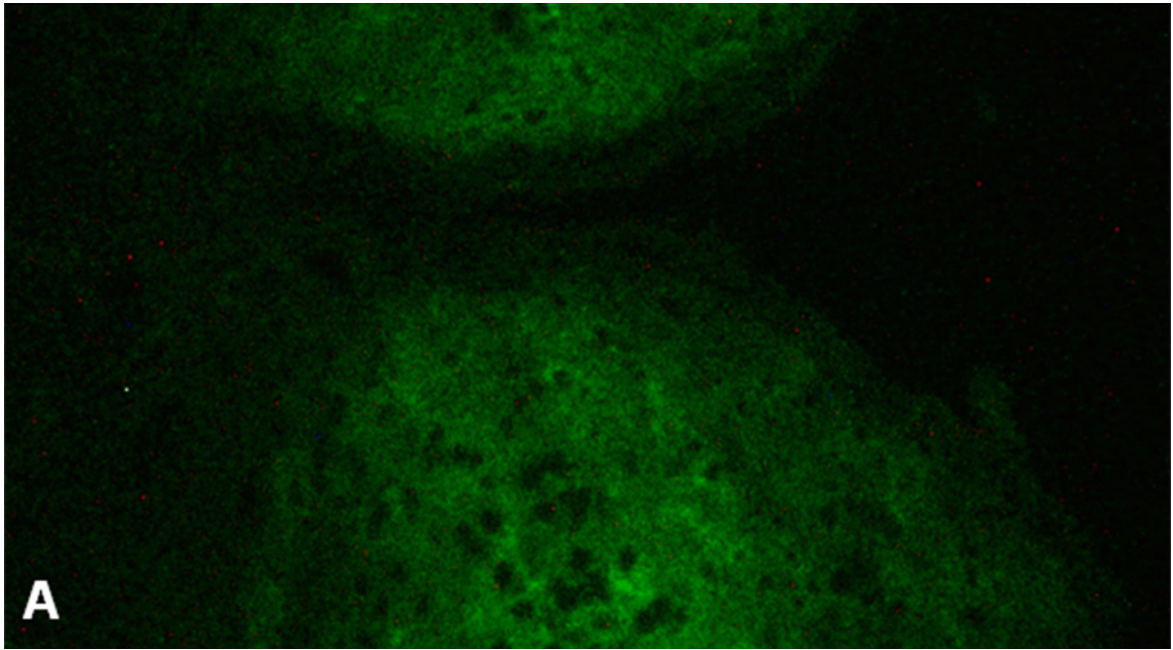


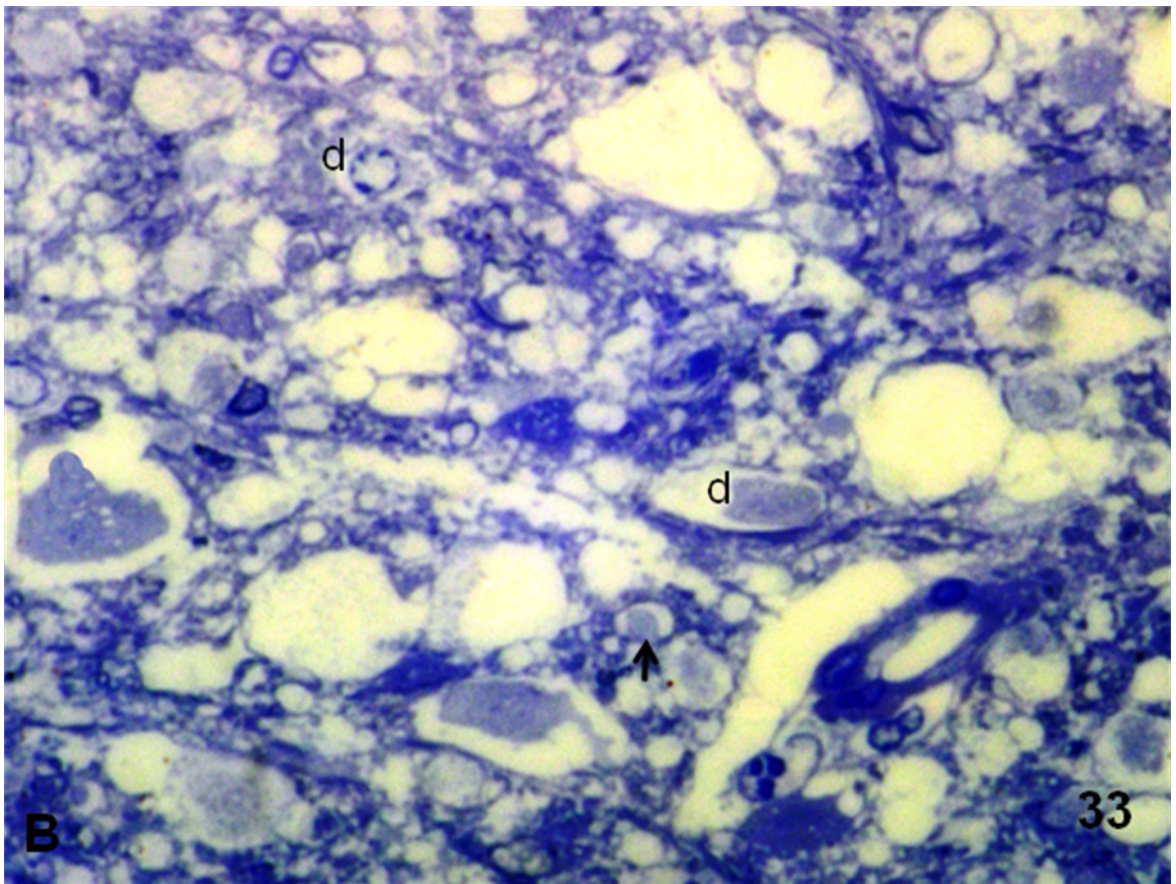
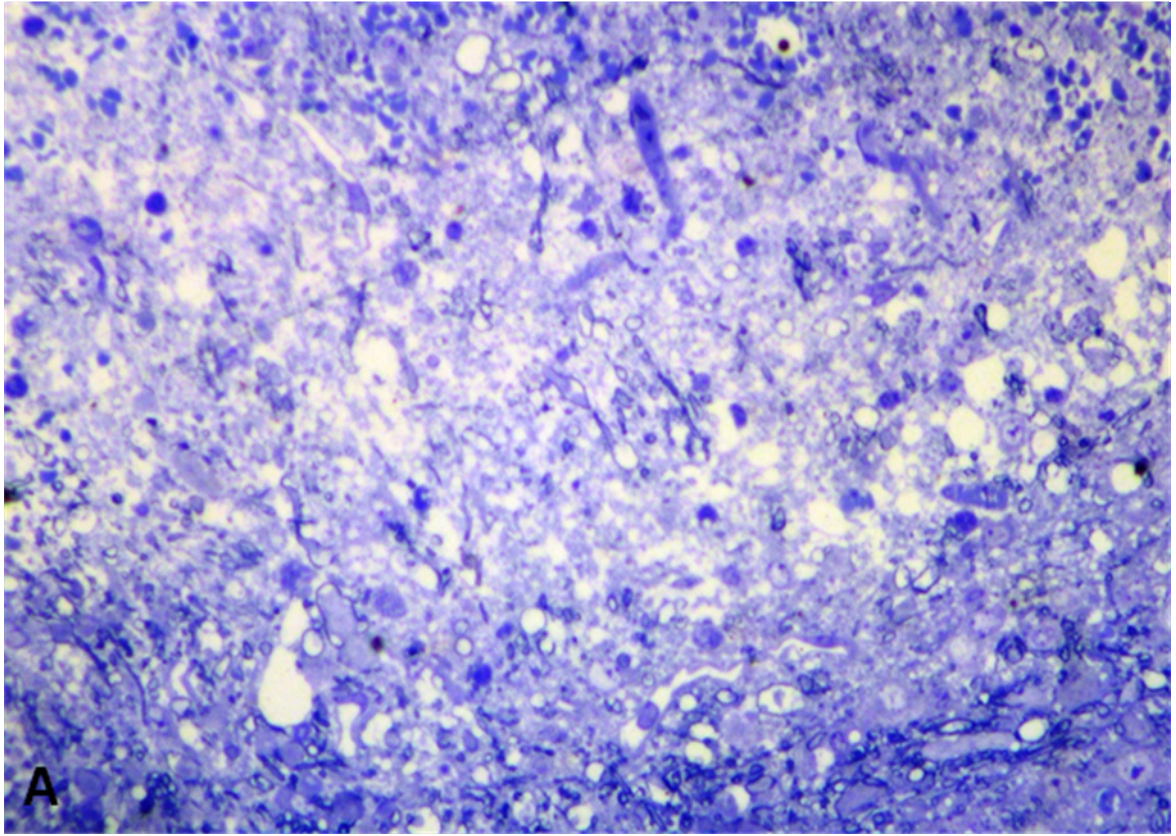
**Figura 31 – Imunofluorescência para Cx43 no encéfalo de camundongos KO para Cx 32. Lesão de 15 dias. A: Controle negativo. Obj.: 20X. B: marcação de astrócitos reativos na área de remielinização. Obj.: 20X. Anti-Cx43 (verde; complexo estreptavidina-biotina-FITC).**



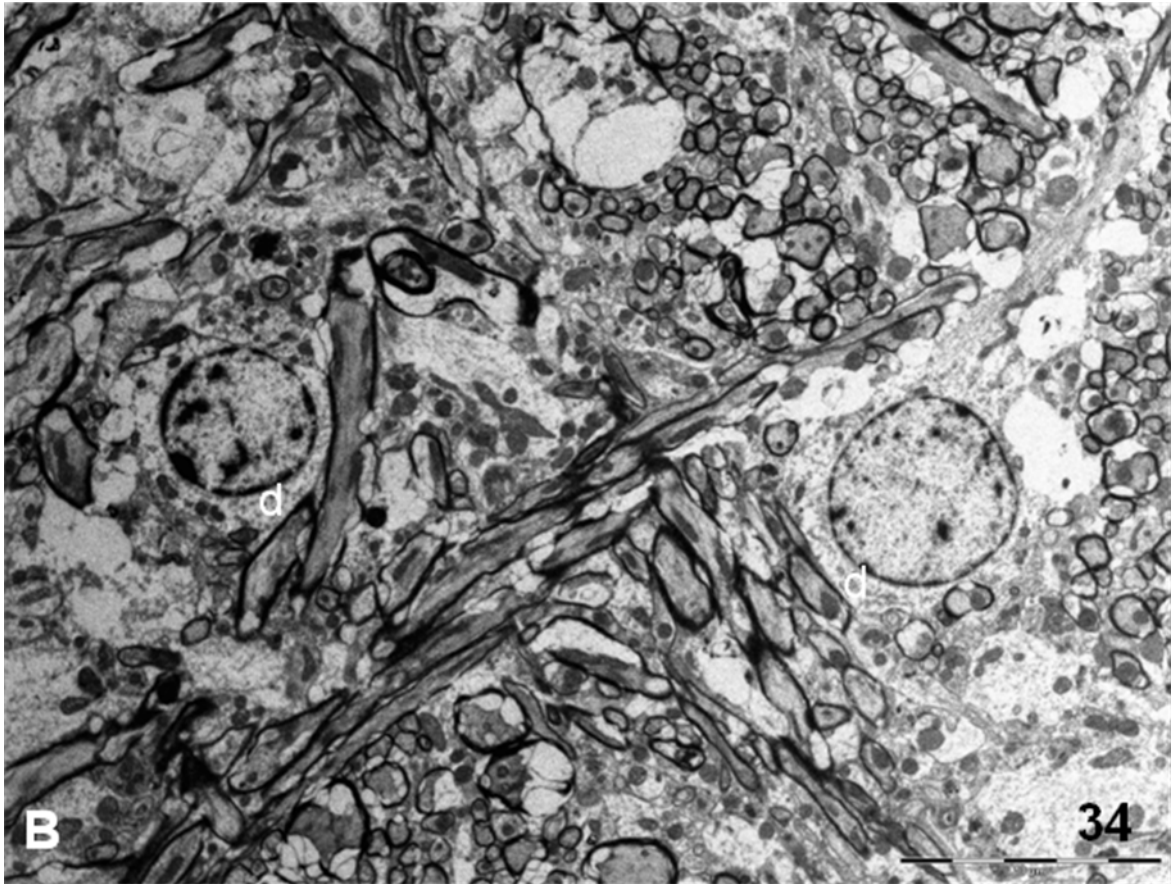
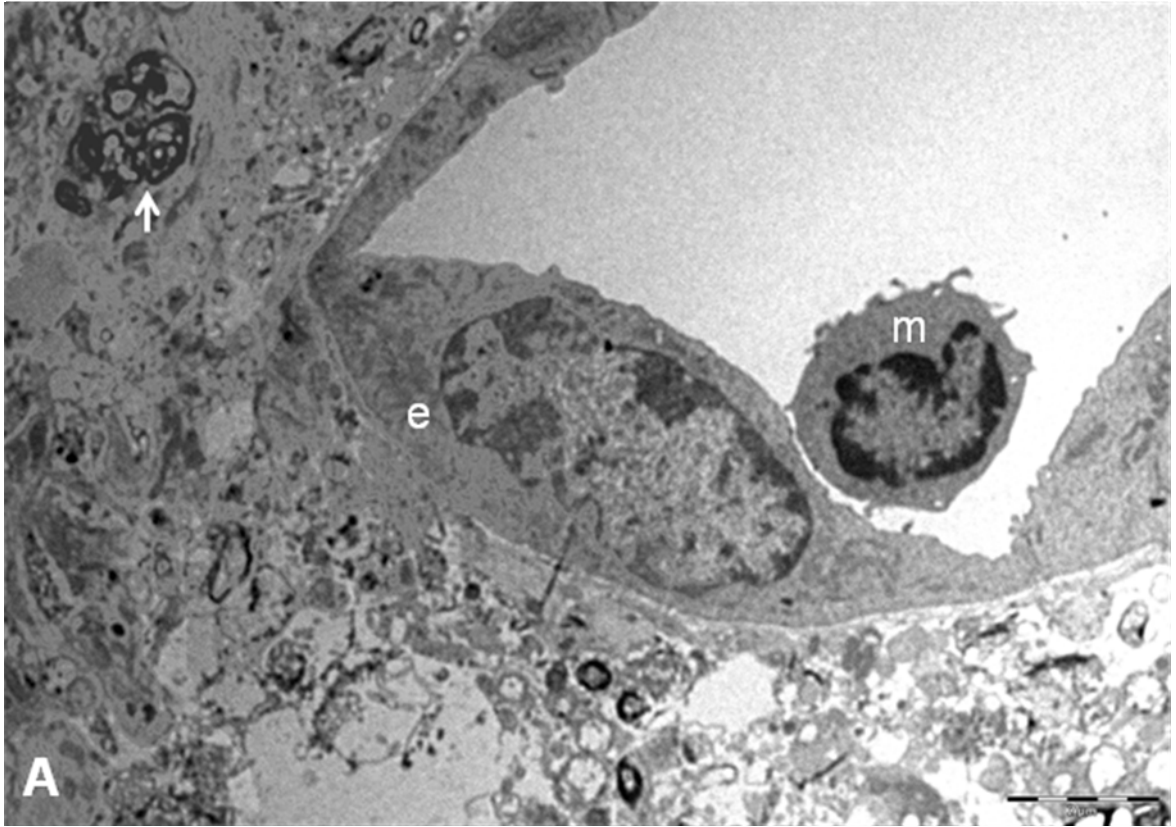
**Figura 32 - Imunofluorescência para OSP no encéfalo de camundongos KO para Cx32. Lesão de 7 dias. A: marcação negativa na periferia da lesão. Obj.: 20X. B: marcação positiva na mesma área. Obj.: 20X. Anti-OSP (verde; complexo estreptavidina-biotina-FITC).**



**Figura 33 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, no centro de lesão de 24 horas induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo normal. Expansão do espaço extracelular e visualização de algumas células intoxicadas. Obj.: 20X. B. Camundongo KO. Observa-se degeneração (d) das células gliais, expansão do espaço extracelular por desaparecimento de algumas células e axônios tumefeitos (seta). Obj.: 40X.**

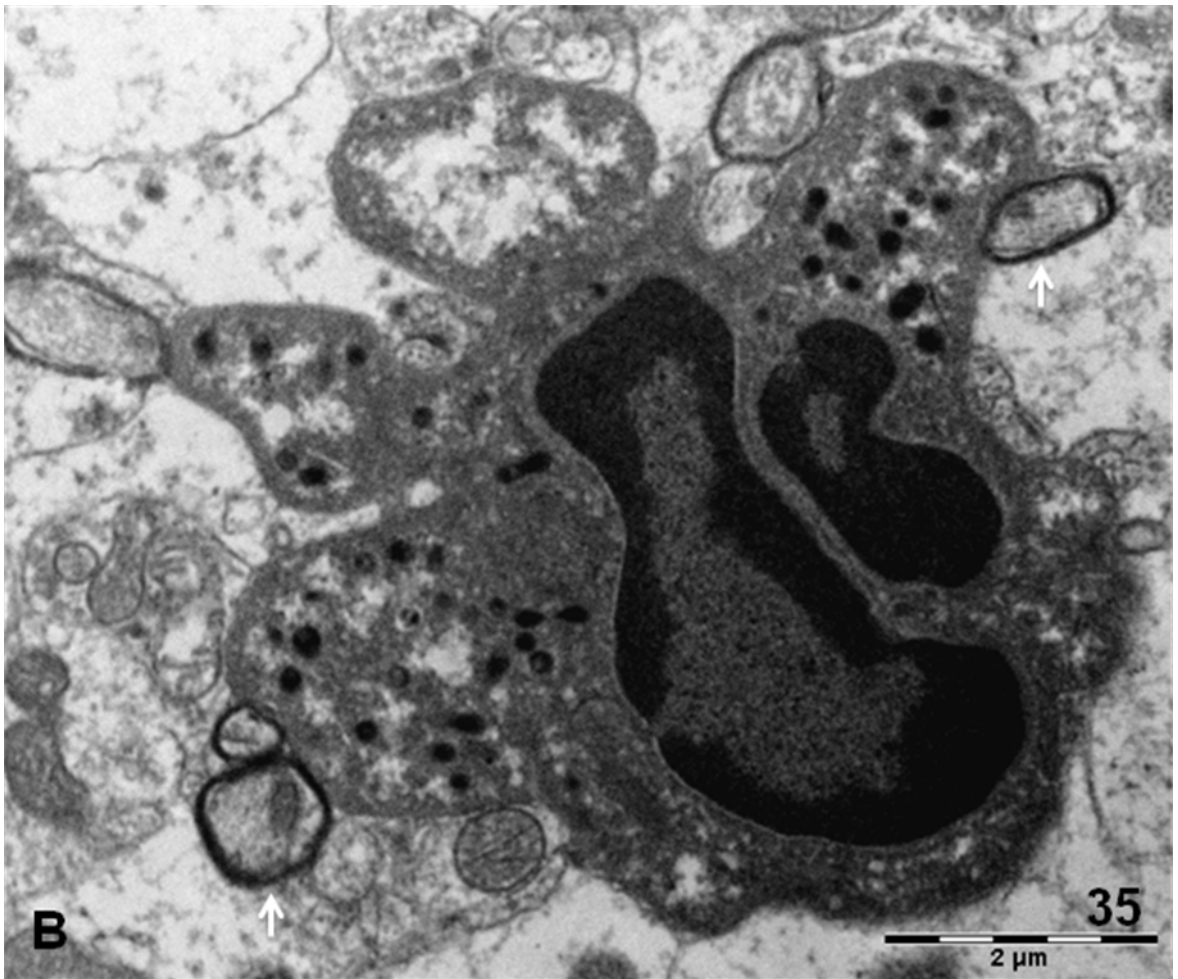
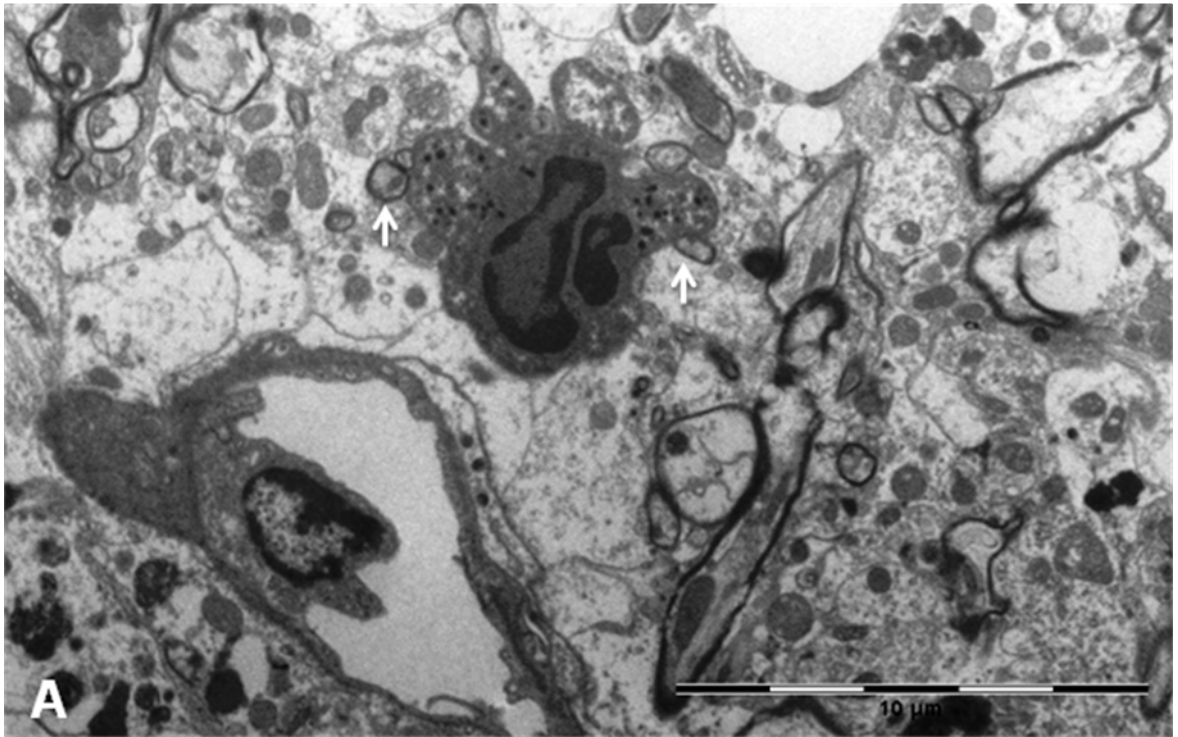


**Figura 34 – Ultra-estrutura, lesão de 3 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo normal. Observa-se expansão do espaço extracelular por desaparecimento das células glias. O citoplasma de uma célula fagocitária com restos mielínicos é observado no ângulo superior esquerdo (seta). A célula endotelial (e) do vaso sanguíneo da microfotografia não está afetada. Na luz desse vaso observa-se uma célula mononuclear com escassos processos (m: monócito). B. Camundongo KO. Células glias degeneradas (d) e bainhas de mielina vesiculadas são observadas em meio ao espaço extra-celular expandido.**

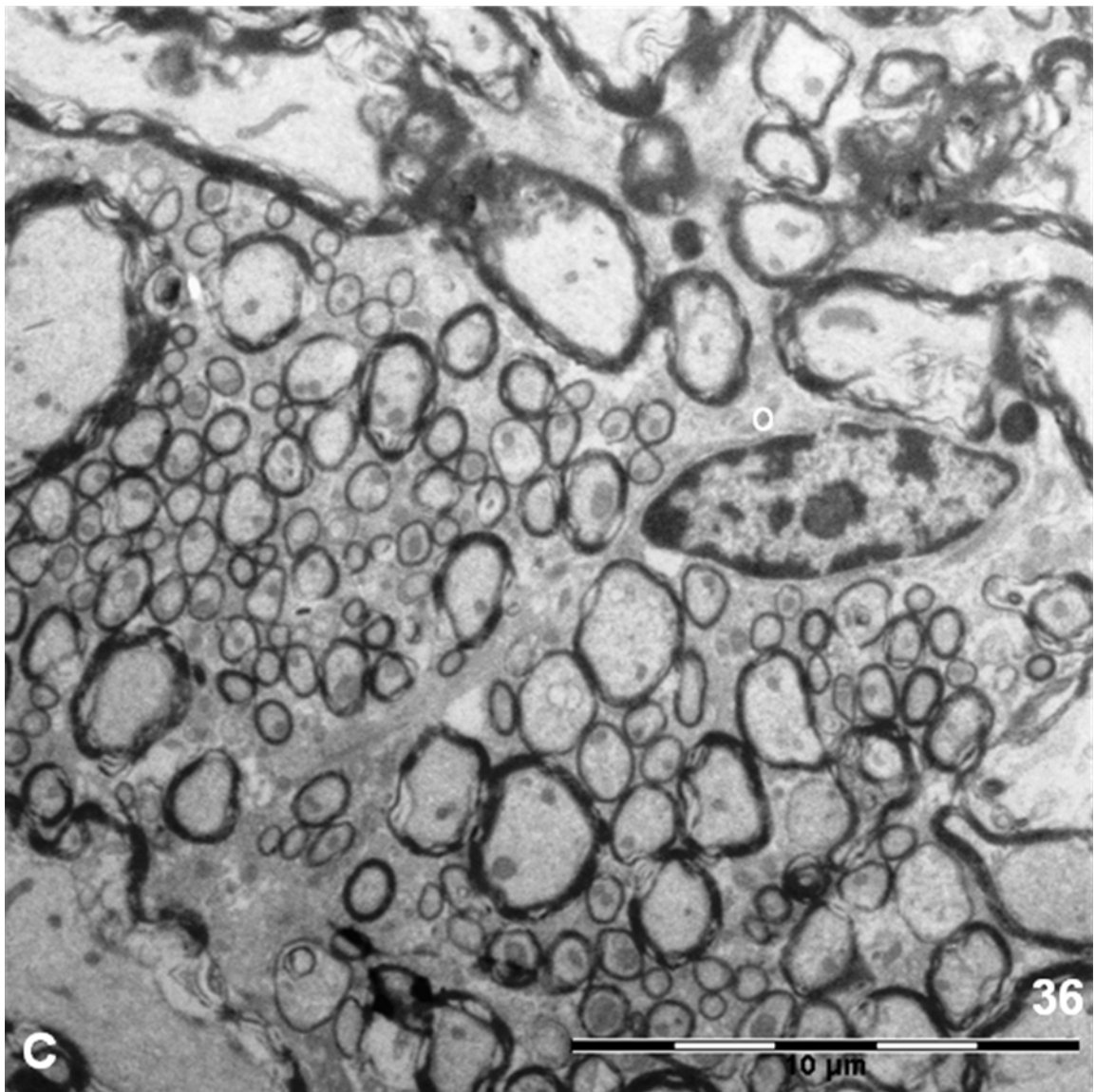
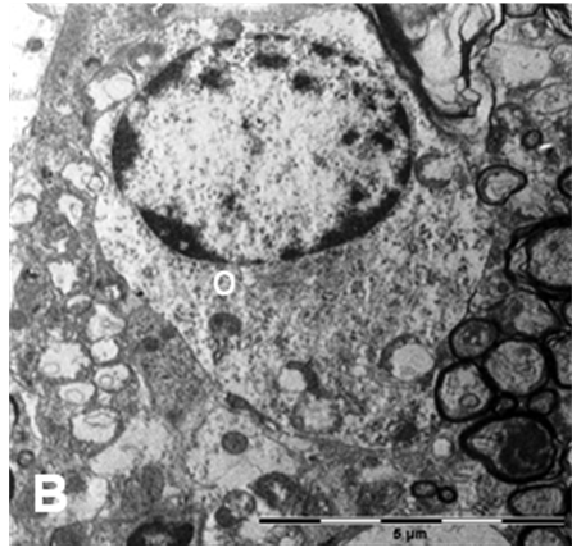
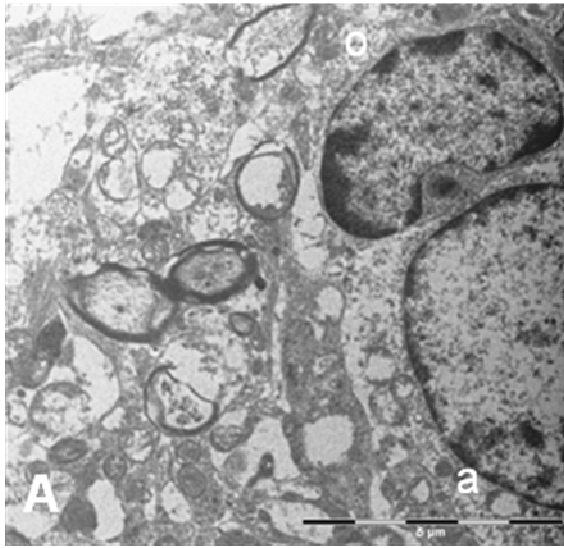




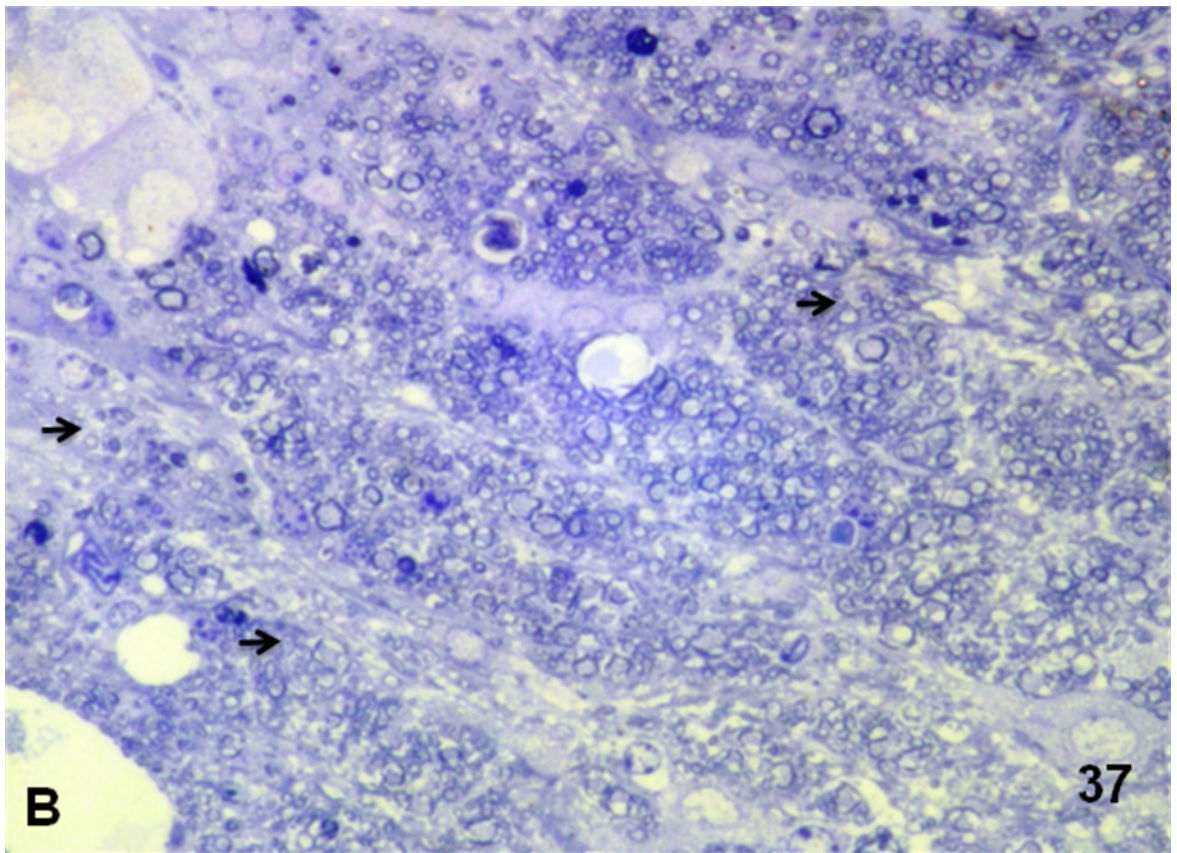
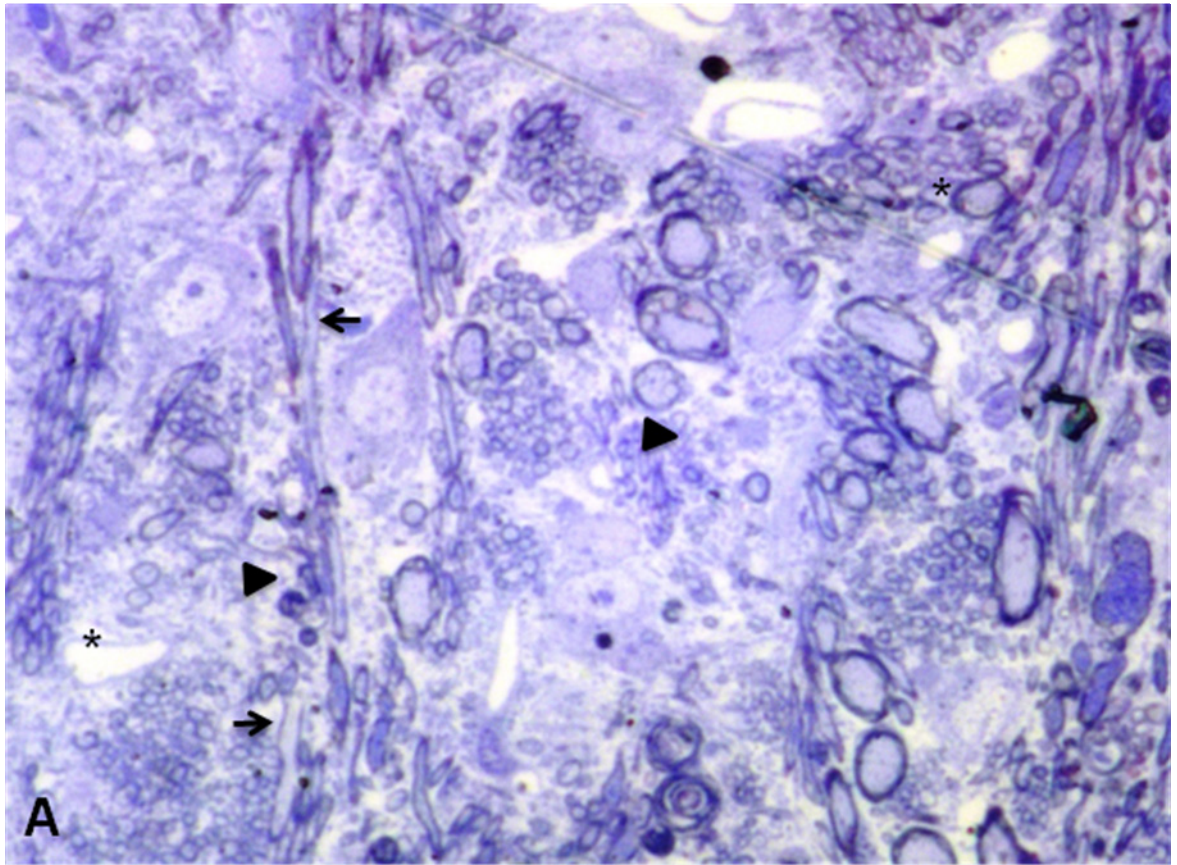
**Figura 35 – Ultra-estrutura, lesão de 3 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo KO. No centro da figura observa-se um polimorfonuclear em estreito contato com bainhas de mielina não mais relacionadas com os oligodendrócitos (setas). B: maior aumento da figura A.**



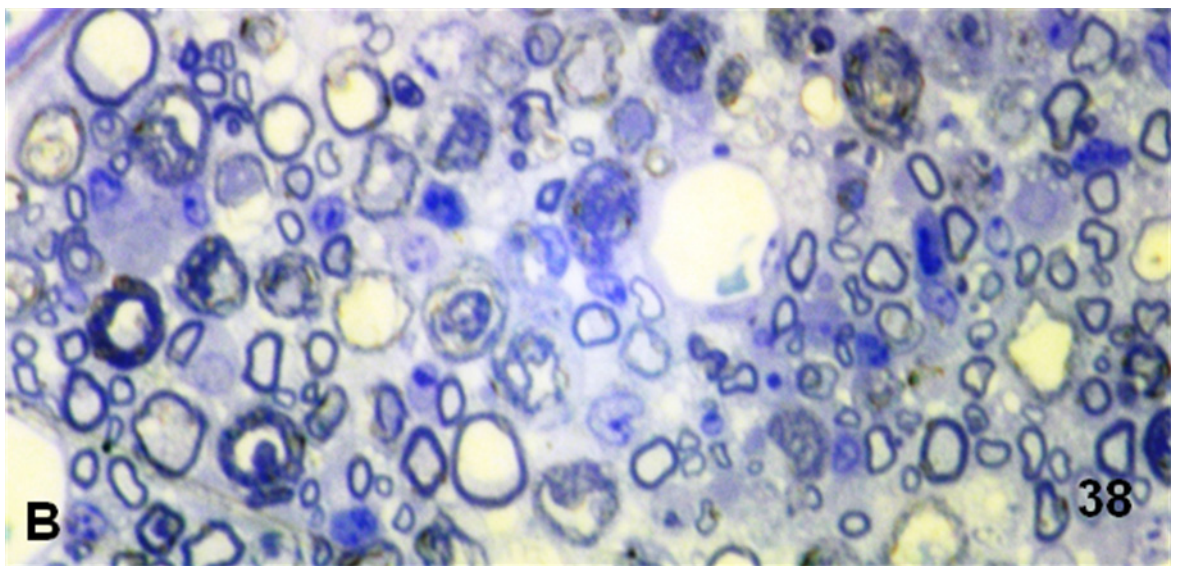
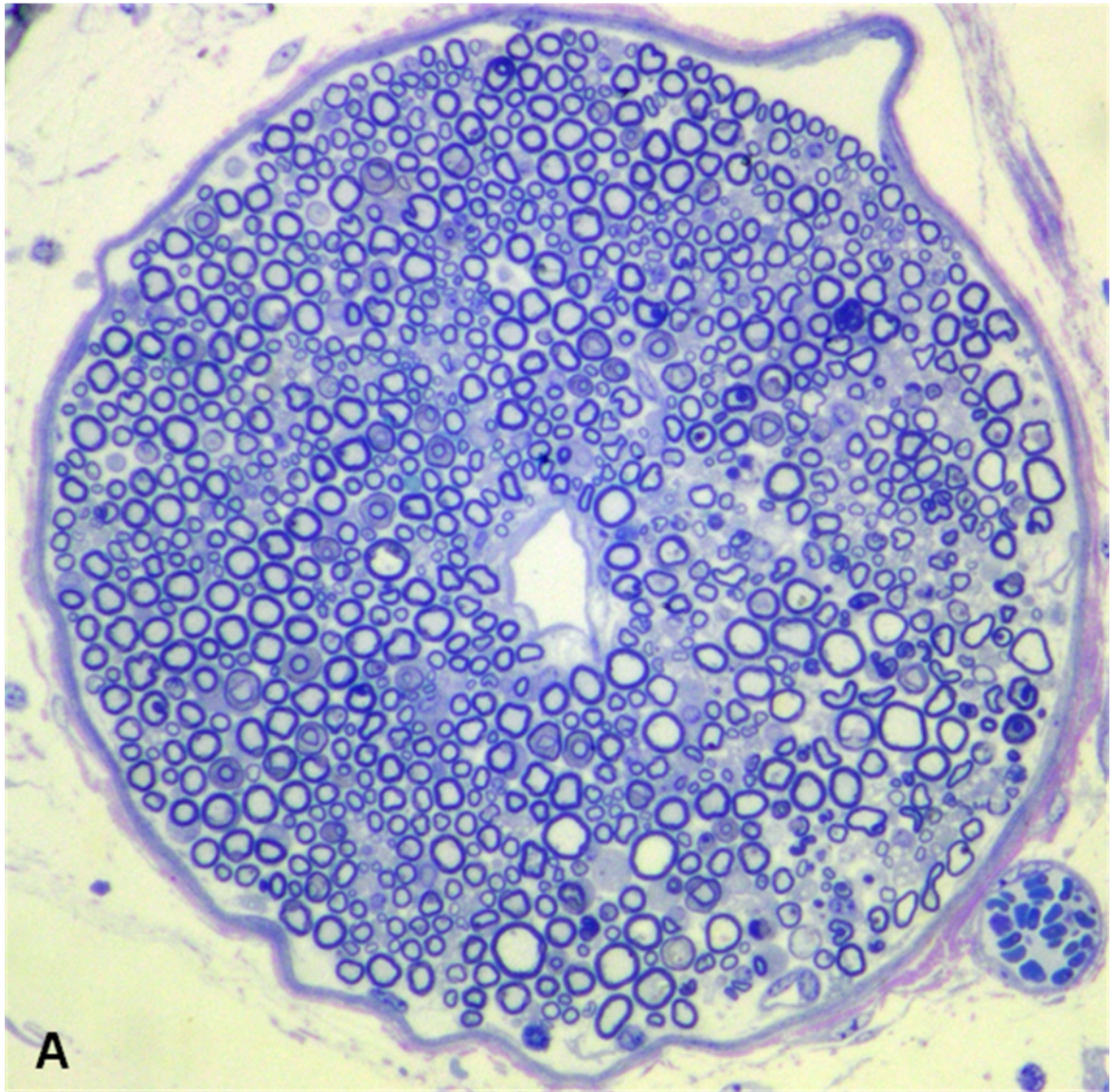
**Figura 36 – Ultra-estrutura, lesão de 15 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo KO. Oligodendrócito (o) e astrócito (a) adjacentes na periferia de lesão. B. Oligodendrócito (o) na periferia da lesão. C. Oligodendrócito (o) relacionado com numerosas bainhas de mielina finas e mal compactadas na adjacência do tecido normal (parte superior da figura).**



**Figura 37 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio na ponte. Lesão com 21 dias A. Camundongo normal: axônios mostram bainhas finas de mielina (remielinizadas - setas). São visualizados numerosos vasos sanguíneos (asterisco). Obj.: 40X. B: Camundongo KO: axônios mostram bainhas finas de mielina (remielinizadas - setas). Obj.: 20X.**

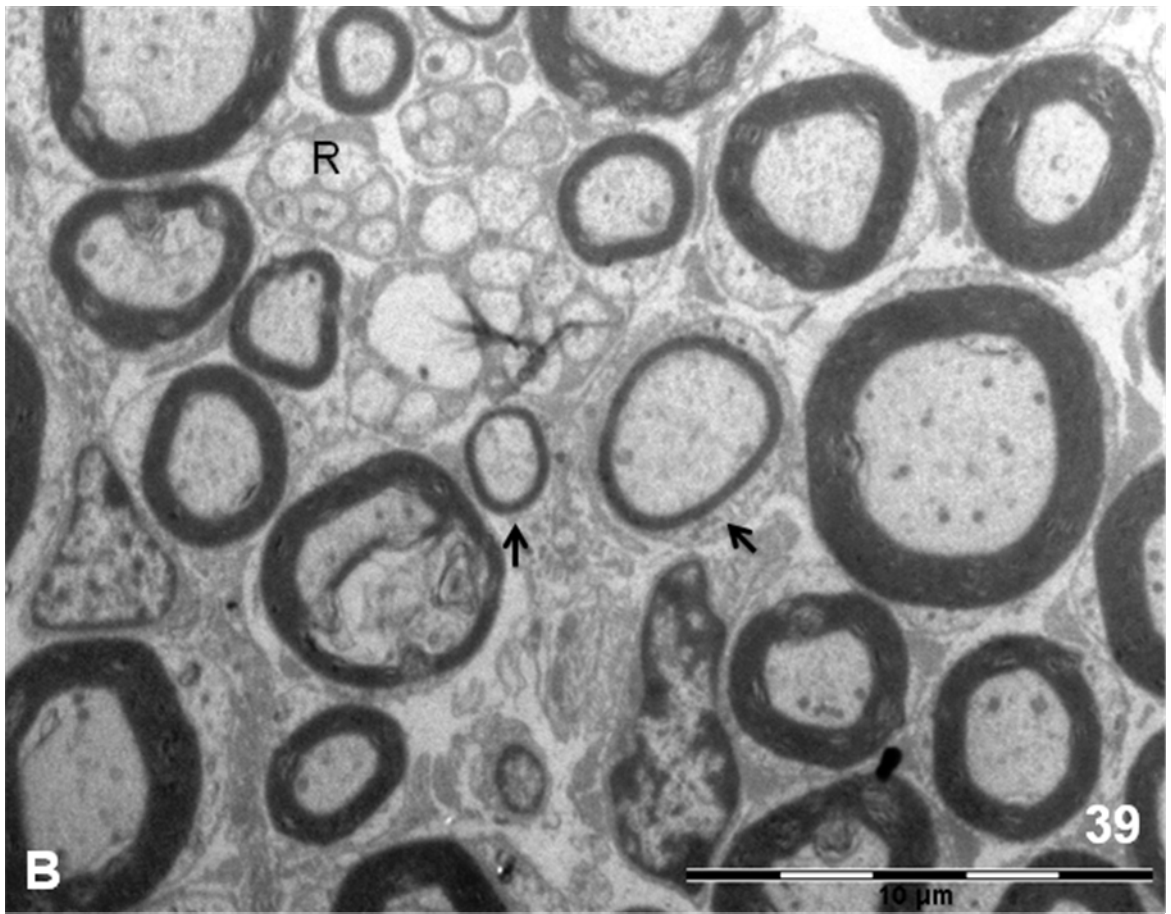
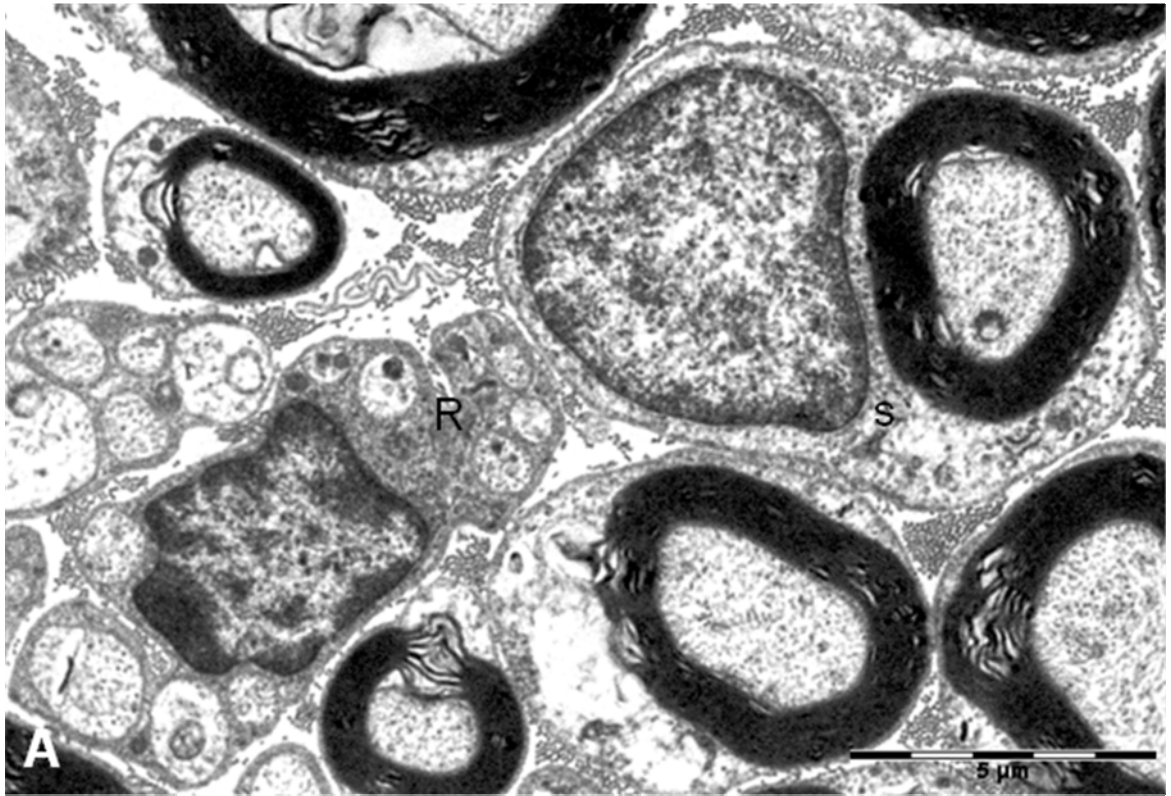


**Figura 38 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático. Lesão com 48 horas em camundongo KO. A. Edema na região lateral direita do fascículo. Obj.: 20X. B. Aspecto aproximado onde se observa vesiculação das bainhas de mielina, presença de macrófagos (m) e polimorfonucleares (pmn) e expansão do endoneuro por edema. Obj.: 40X.**

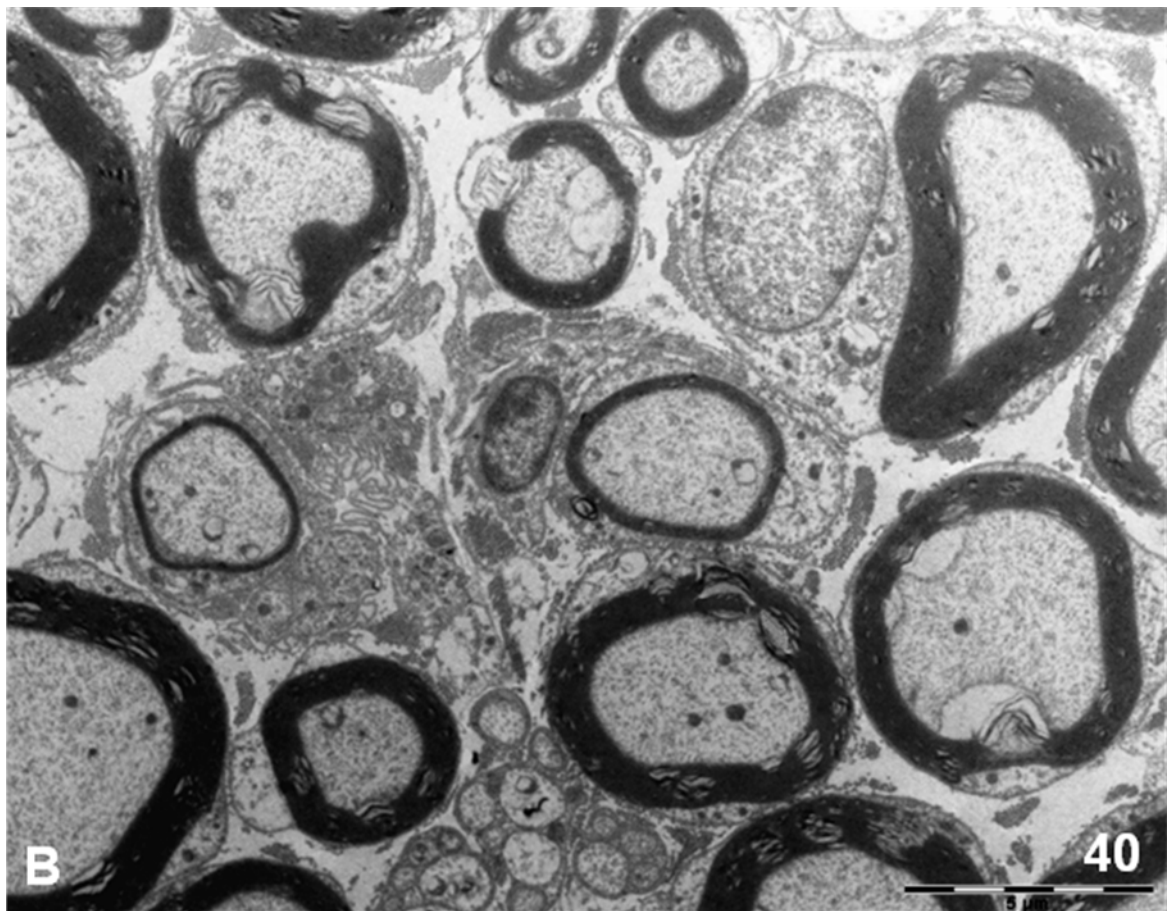
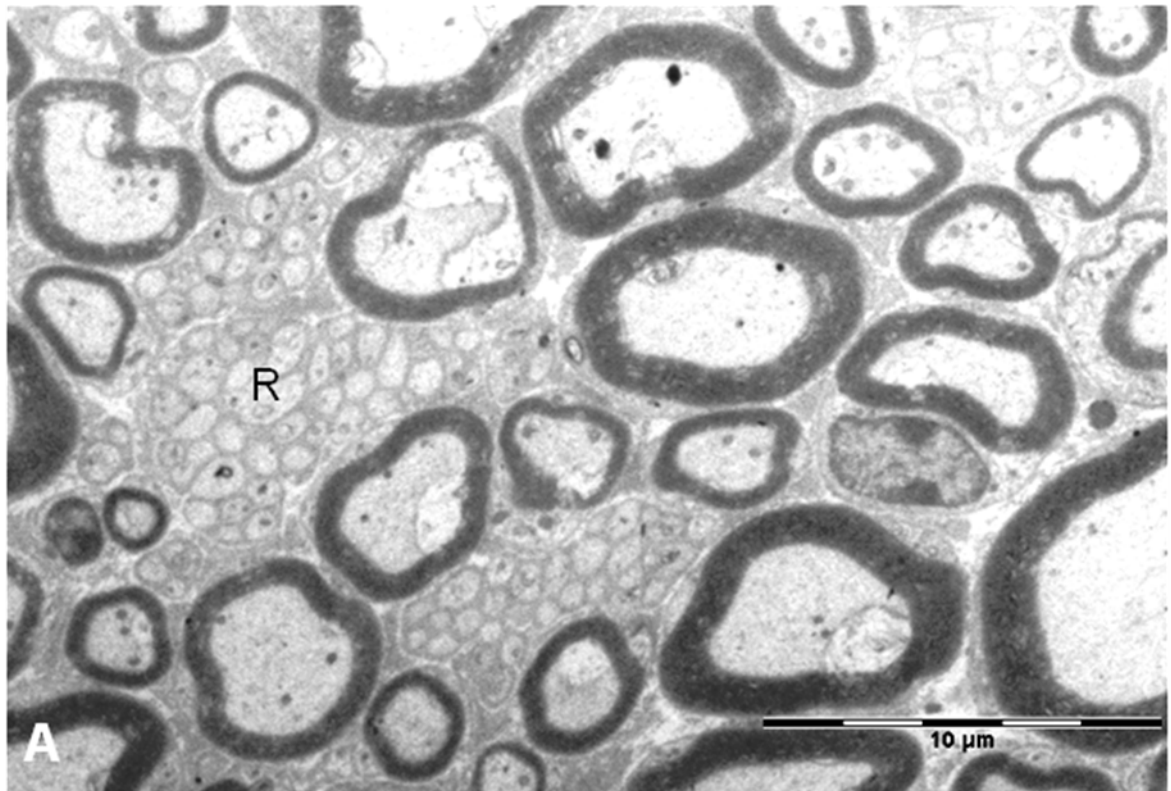




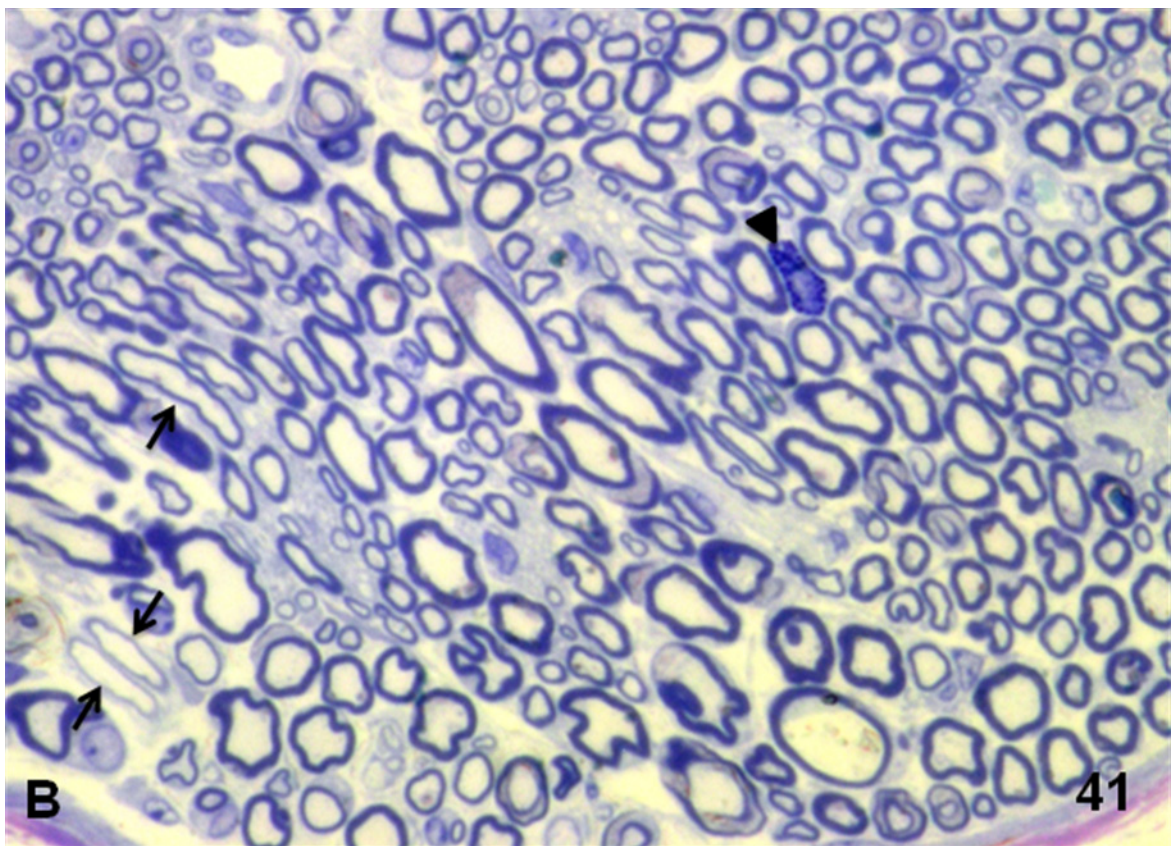
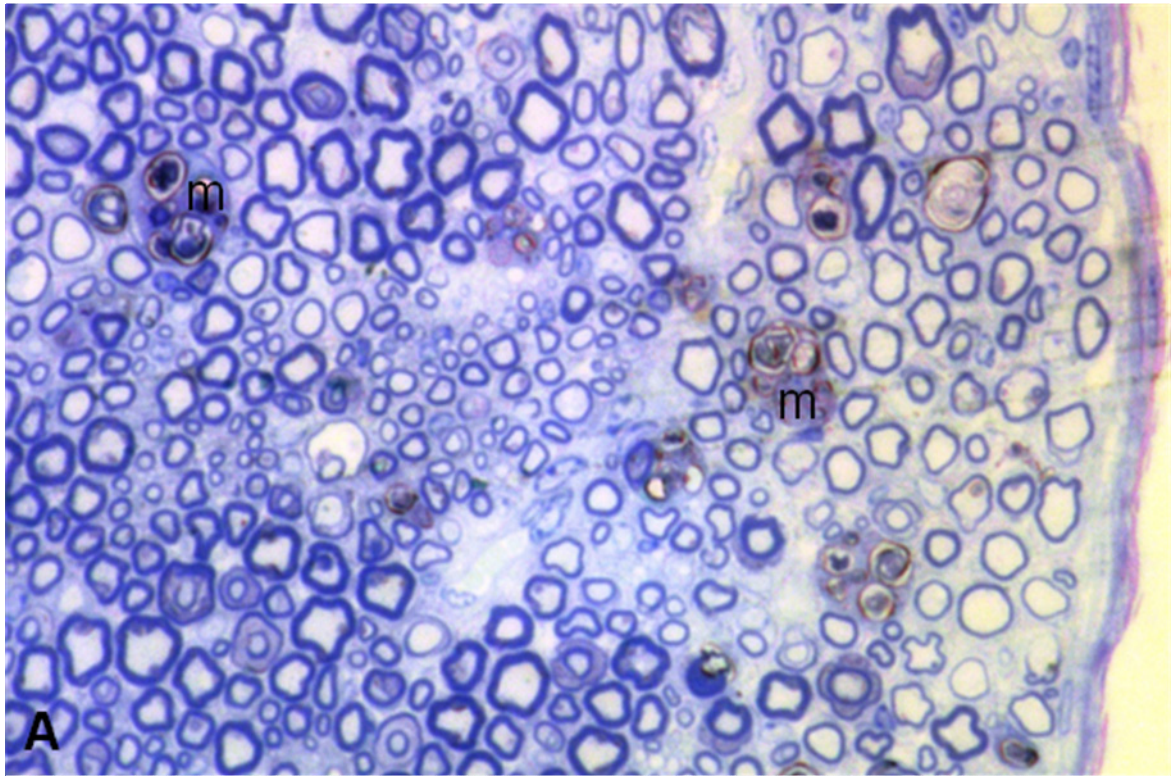
**Figura 39 – Ultra-estrutura, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático de comundongos KO. A. Lesão de 48 horas. Edema do citoplasma das células de Schwann (s) associadas a bainhas de mielina e início de vesiculação das mesmas. R: fibra de Remak. B. Lesão de 7 dias. São observadas bainhas de mielina finas e bem compactadas (setas) em meio a bainhas normais e fibras de Remak.**



**Figura 40 – Ultra-estrutura, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático de comundongos KO. A. Lesão de 21 dias na qual se observam axônios com bainhas de mielina fina e numerosas fibras de Remak (R). B. Lesão de 30 dias com visão aproximada das bainhas remielinizadas e as células associadas.**



**Figura 41 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático. Lesão com 30 dias em camundongo KO. A. numerosas bainhas finas (remielinizadas) com alças redundantes (*tomacula*) são observadas à direita da figura. Há alguns macrófagos (m) remanescentes no tecido. Obj.: 40X. B. Bainhas finas (remielinizadas) em cortes longitudinais são conspícuas no tecido (setas). Há um mastócito entre as fibras (cabeça de seta). Obj.: 40X.**



## DISCUSSÃO

Os modelos experimentais de desmielinização/remielinização são desenhados para mimetizar os processos deletérios observados em doenças degenerativas crônicas e/ou recorrentes da mielina, i.é esclerose múltipla no SNC e síndrome de Guillain-Barré no SNP. Os modelos de cunho imunológico são os mais indicados, no entanto, aqueles que usam drogas de ação local ou sistêmica são os mais difundidos pela facilidade de realização.

O modelo do brometo de etídio (BE) é considerado paradigma dos eventos de desmielinização e remielinização no SNC (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986) e no SNP (RIET-CORREA et al., 2002). Variações desse modelo têm norteado as pesquisas que visam esclarecimentos a serem aplicados nas doenças degenerativas espontâneas da mielina (BONDAN et al., 2000; MAZZANTI et al., 2006; SALLIS et al., 2006; BONDAN et al., 2006; MAZZANTI et al., 2007). Ao longo do tempo as variações introduzidas neste modelo desmielinizante vêm enriquecendo o conhecimento e contribuindo para a introdução, ampliação e aprimoramento de sofisticadas técnicas usadas no trabalho experimental.

O BE é gliotóxico e induz ao desaparecimento precoce da macróglia após a injeção local no tronco encefálico de ratos normais (PEREIRA et al., 1998) e imunossuprimidos (BONDAN et al., 2000; BONDAN et al., 2004; BONDAN et al., 2006), e intoxicação das células de Schwann quando injetado no nervo ciático de ratos (RIET-CORREA et al., 2002). O processo desmielinizante no SNC caracteriza-se pela morte da glia e vesiculação e retirada das bainhas de mielina não mais sustentadas pelos oligodendrócitos degenerados e mortos. Em ratos, esses eventos são precoces no centro das lesões (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986), e são acompanhados pela mobilização da micróglia e influxo de fagócitos hematógenos. Esse influxo evidente não é observado nas lesões dos camundongos KO, e é reduzido nas lesões dos camundongos normais (SW e C57BL-6). No SNP, as células de Schwann intoxicadas rejeitam suas bainhas mas não morrem, fato registrado como norma nas lesões dos nervos periféricos, independente da etiologia do processo (CAVANAGH, 1990). O nervo ciático dos camundongos deste estudo mostra resposta semelhante, com edema intracelular e destruição das bainhas de mielina com preservação dos axônios (desmielinização segmentar).

Nos experimentos aqui descritos, foram usados unicamente camundongos machos, de oito semanas de idade. Nos estudos feitos em ratos, o sexo não teve influência no desenvolvimento das lesões (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986). A utilização de camundongos jovens foi induzida por relatos de que o reparo de bainhas de mielina perdidas após um

episódio de desmielinização é dificultado em ratos idosos (GILSON & BLAKEMORE, 1993); a recuperação tecidual mostra-se diminuída com o avanço da idade, fato mais acentuado no sistema nervoso que tem, pelas suas características morfo-funcionais não redundantes, grande dificuldade em retornar aos padrões de crescimento presentes durante o desenvolvimento. Foi com o intuito de evitar essa variável que os camundongos usados tinham oito semanas de vida. Seria interessante observar se antes dessa idade a resposta à agressão tóxica era semelhante à dos camundongos normais. Adicionalmente, é relatado na literatura que os camundongos KO para Cx32 demonstram desmielinização espontânea aproximadamente aos 4-6 meses de idade com defeitos subseqüentes da condução nervosa (SUTOR et al., 2000).

Camundongos KO para Cx32 foram usados neste experimento porque eles são desenvolvidos como modelo experimental para uma das formas da doença de Charcot-Marie-Tooth (a CMT1X), caracterizada por eventos de desmielinização espontânea seguidos de remielinização imperfeita a partir das doze semanas de vida (SPRAY & DERMIETZEL, 1995). Certamente, a realização das cirurgias às oito semanas, antecipou-se à fase crítica de degeneração e propiciou que mecanismos alternativos de ação sobre as células de Schwann fossem desencadeados, já que as bainhas reparadas não diferem das bainhas observadas em outros modelos experimentais, incluindo o modelo do BE no SNP de ratos Wistar (RIET-CORREA et al., 2002). A metodologia desenvolvida neste estudo não permitiu a descoberta desses mecanismos e mais pesquisas, genéticas e moleculares, se fazem necessárias para trazer à tona os meios alternativos de resposta das células de Schwann, antes e depois do período crítico de vida desses camundongos geneticamente modificados.

A confirmação das características genômicas dos camundongos C57BL-6 KO para a Cx32 usados neste experimento foi obtida através de PCR. Contudo, segundo Balice-Gordon et al. (1998), a ausência do gene não é suficiente para afirmar que a conexina não é expressa, já que outros genes podem ser ativados como medida compensatória. Por esse motivo, a realização de IF para a marcação negativa da Cx32 foi fundamental para a confirmação da ausência da proteína e interpretação dos resultados. Os mesmos autores discutem, ainda, a possibilidade da existência de junções comunicantes não funcionais, embora a conexina esteja presente. A metodologia eletrofisiológica para a demonstração dessa funcionalidade foge ao escopo deste estudo, bem como a pesquisa da expressão de conexinas ou de outras moléculas alternativas.

A dose de BE (10 µl a 0,1%) usada em ratos induz lesões que ocupam áreas variáveis da ponte, e são de localização ventral ou central. Nos ratos normais as lesões do SNC são de desenvolvimento diferenciado, principalmente pela indução da atividade fagocítica; as lesões



com poucos fagócitos nas fases degenerativas iniciais mostram acúmulo de bainhas vesiculadas e reparo mais tardio do que aquelas caracterizadas por abundante presença macrofágica (GRAÇA, 1989a). Retardo semelhante no desenvolvimento das lesões é observado em ratos imunossuprimidos com ciclofosfamida (BONDAN et al., 2000) e dexametasona (BONDAN et al., 2004), e na desmielinização experimental por BE em ratos com diabete induzida pela estroptozotocina (BONDAN et al., 2006). Nos camundongos normais e KO, o influxo macrofágico é escasso, o que pode ser explicado pelo tamanho reduzido das lesões, com pouca destruição tecidual e baixo estímulo para a atividade fagocítica, embora nestes animais não foi observado o acúmulo de membranas derivadas da mielina (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986), explicado como decorrente da tardia atividade macrofágica.

Um fato novo em relação às lesões do SNC induzidas pelo BE é a presença de PMN nas lesões, em atitude de estreito contato com as bainhas de mielina, semelhante àquela demonstrada pelos fagócitos mononucleares. A presença dos PMN num tecido com o qual eles não têm afinidade poderia ser explicada, tal como foi a presença de linfócitos nas lesões induzidas pelo BE em ratos Wistar (GRAÇA, 1988b), não visualizados nos camundongos deste estudo, como parte integrante da resposta inflamatória à destruição de células e bainhas. Tampouco pode ser esquecido que o BE induz, além do efeito especificamente gliotóxico, uma reação inflamatória inespecífica, que nos animais deste estudo pode incluir até uma resposta por PMN, desde que as células moduladoras das atividades imuno-inflamatórias no tecido, os astrócitos, são destruídos precocemente após a injeção do BE. Nos modelos de desmielinização tóxica tem sido notado que a resposta reparativa é diferente de acordo com a espécie animal usada (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986); a resposta do tecido à agressão pode, também, mostrar variações de caráter geral como a presença de PMN observados no presente estudo e a ausência de linfócitos que foram conspícuos no modelo em ratos.

Nos camundongos, a dose usada (5  $\mu$ l a 0,1%) induz lesões menores do que as induzidas em ratos. De fato, as lesões são tão discretas que, em alguns casos, a visualização à microscopia de luz requereu a marcação imunoistoquímica do tecido. À semelhança do observado em ratos, a recuperação dos animais após cirurgia é rápida e eles não demonstram nenhuma seqüela neurológica, fato notado em estudos anteriores (PEREIRA et al., 1998).

As lesões dos camundongos do presente experimento observadas pelo HE são discretas e caracterizadas por espongiöse que se resolve ao longo do tempo e aos trinta dias áreas císticas focais ocorrem como lesões residuais. Em ratos, as lesões induzidas pelo BE no tronco encefálico, também se resolvem através de formações císticas, por vezes multiloculares

(PEREIRA et al., 1998), motivo pelo qual o modelo do BE foi cogitado para mimetizar lesões isquêmicas, de ocorrência freqüente em seres humanos. Através do LFB foi possível observar a interrupção das bainhas de mielina na fase aguda pós-injeção e o aumento da celularidade que caracteriza a fase subaguda das lesões, quando o tecido se prepara para a remielinização por meio de oligodendrócitos remanescentes da periferia das lesões OSP-positivos (SALLIS et al., 2006) ou através de oligodendrócitos jovens diferenciados dos progenitores presentes no tecido (BONDAN et al., 1998). No presente estudo, a existência de oligodendrócitos OSP-positivos foi detectada por IF; essas células localizavam-se na periferia das lesões onde a remielinização é notada inicialmente. A IF para OSP era de intensidade semelhante à observada por Sallis et al. (2006) no tronco encefálico de ratos desmielinizados por brometo de etídio; a presença dessa proteína, característica de oligodendrócitos maduros, indica que células com reserva potencial, na periferia das lesões e nas adjacências do tecido normal, realizam o reparo das bainhas perdidas, fato confirmado através da microscopia eletrônica de transmissão.

Os métodos imunistoquímicos evidenciaram a ausência das células gliais nas áreas de lesão, nas fases iniciais após a intoxicação, seguida da marcação de finos processos celulares de astrócitos e oligodendrócitos nas fases de reparo; no presente experimento os processos eram mais finos do que os profusos processos detectados em ratos normais (BONDAN et al., 2003), e imunossuprimidos com ciclofosfamida (SANCHEZ et al., 2006) após desmielinização/remielinização induzida pelos brometo de etídio. A reatividade astrocitária à GFAP a partir dos quinze dias pós-injeção e oligodendrocítica à CNPase a partir dos vinte e um dias pós-injeção, mostram que a presença dos processos astrocitários são necessários para que os oligodendrócitos remielinizem os axônios desmielinizados após a intoxicação das células pelo BE. Tal cronologia da marcação demonstra que o oligodendrócito necessita do astrócito para remielinizar (assim como o necessita para mielinizar) e aponta, mais uma vez, o astrócito como terceiro elemento do tecido nervoso para a mielinização (remielinização) e condução (BLAKEMORE, 1975); os outros dois são o axônio e o oligodendrócito.

Estudos recentes confirmam através da IF para Cx43 (ROSCOE et al., 2007b), que ela estava aumentada nas lesões onde os processos astrocitários estavam hipertrofiados. Os autores observaram regulação positiva dessa proteína em lesões remielinizantes no modelo de EAE crônica em cobaias e em camundogos heterozigotos para essa conexina (ROSCOE et al., 2007a). Os autores observaram a virtual ausência da Cx43 nas lesões desmielinizadas, enquanto que essa conexina estava consideravelmente aumentada nas áreas remielinizadas, citam que em até 300-500%. A diminuição dessa conexina é relacionada com lesões

degenerativas espontâneas, nem sempre relacionadas com a perda da mielina, mas, o processo de recuperação das lesões nos indivíduos deficientes é sempre incompleto. O aumento da Cx43 foi registrado visualmente no presente estudo, embora sem quantificação, e mostra os astrócitos como as células com um papel marcante na fase de reparo do tecido, a partir dos 15 dias pós-injeção quando a remielinização por oligodendrócitos é notada na ultra-estrutura.

Os estudos de microscopia eletrônica permitiram observar as alterações celulares e axonais dos camundongos normais e KO para Cx32 após a intoxicação por BE. Tais alterações são semelhantes às observadas em estudos anteriores em ratos (PEREIRA et al., 1998; BONDAN et al., 2000). Nesses estudos, uma característica da remielinização do tecido lesado é a atividade reparadora de oligodendrócitos e células de Schwann que invadem o SNC a partir dos espaços perivasculares e subpiais, uma vez que os astrócitos intoxicados morrem (GRAÇA, 1989b). Nas lesões dos camundongos normais ocasionais células de Schwann são observadas a partir dos sete dias pós-injeção em relação com axônios desmielinizados, enquanto que nos camundongos KO, essa invasão por células de Schwann não é observada; uma explicação provável para esse fato é apresentada abaixo.

A observação de ocasionais células de Schwann mielinizantes de axônios do SNC é relatada em situações normais para fibras da retina (BUSSOW, 1978). Nos ratos injetados com BE, a presença dessas células é conspícua, e nas lesões na medula espinhal são as células remielinizantes preponderantes, enquanto que no encéfalo predomina a remielinização por oligodendrócitos (PEREIRA et al., 1998; BONDAN et al., 2000). Nos camundongos normais deste estudo raras células de Schwann foram vistas nas lesões, fato tentativamente explicado pelo tamanho reduzido das lesões com pouca destruição astrocitária e, portanto, mínima descontinuidade da glia limitante (BLAKEMORE, 1975). Mesmo assim, para essas ocasionais células de Schwann vistas no tecido, a atração axonal foi suficiente, provavelmente mediada pela Cx32.

A ausência de células de Schwann nos camundongos KO explica, ao menos parcialmente, a expansão do espaço extracelular observada nas lesões nos tempos estudados. As células de Schwann que invadem o SNC produzem e secretam elementos da matriz amorfa e fibrosa que são necessários para a migração, diferenciação e orientação dessas células para fins de produção das bainhas de mielina (GRAÇA, 1989b). Sem esses componentes, o espaço extracelular permanece expandido até a completa recuperação astrocitária, que realiza o preenchimento do tecido lesado através de gliose e a delimitação de cavidades císticas remanescentes.

Se desconsiderarmos a ausência de células de Schwann nas lesões do SNC, o desenvolvimento das lesões obedeceu ao padrão observado em outras espécies e em camundongos normais. A Cx32 é a proteína mais importante encontrada nas bainhas de mielina e no oligodendrócito; nas bainhas periféricas ela ocorre nas regiões paranodais e nas incisuras de Schmidt-Lantermann (BALICE-GORDON et al., 1998). A ausência de Cx32 nos camundongos KO sugere que essa proteína possa ser necessária para a atração de células de Schwann para o SNC. Assim, a destruição de astrócitos e a membrana limitante glial não foram suficientes nas lesões aqui descritas para atrair as células de Schwann (GRAÇA, 1989b) e mecanismos mais complexos do que um axônio que perdeu sua bainha de mielina e requer remielinização parece que estão envolvidos. Uma outra possibilidade para a não invasão das células de Schwann no SNC é o fato de que as lesões resultantes da intoxicação são pequenas e, portanto, com pouca destruição astrocitária. Ambos fatores, tamanho das lesões e ausência da Cx32, podem ter contribuído para sustar a invasão.

A remielinização dos axônios desmielinizados na periferia das lesões pelos oligodendrócitos inicia e progride a partir das adjacências do tecido normal, e com a assistência astrocitária. O suporte astrocitário é mecânico (GRAÇA & BLAKEMORE, 1986) e molecular, muito provavelmente através das junções comunicantes heterólogas formadas pelas Cx32 e 47; a Cx47 é mais abundante nos astrócitos (KAMASAWA et al., 2005) e eles são as células da macróglia que se recuperam mais rapidamente após a agressão pelo BE. A confluência dos processos de ambas as células macrogliais foi confirmada pela IHQ que também mostrou que a marcação dos processos astrocitários precede à marcação dos processos oligodendrogliais. Nos camundongos KO a expressão de conexinas alternativas ou a atuação de moléculas não definidas neste estudo, podem suprir a falta da Cx32 já que os oligodendrócitos conseguem remielinizar os axônios desmielinizados.

Sutor et al. (2000) relatam que a espessura das bainhas de mielina no neocórtex de camundongos KO para Cx32 é menor do que a observada nos camundongos normais. O observado em relação às bainhas reparadas nos animais KO injetados com BE é de que elas apresentam uma espessura ainda menor, preservando-se assim a relação descrita por Beuche & Friede (1985) através da análise de fibras periféricas nos processos de remielinização espontânea e experimental, aplicável também ao SNC. A realização de estudos morfométricos nas lesões seria interessante para a comparação entre as bainhas da ponte de camundongos normais e KO para Cx32 após a injeção local de BE. Mesmo de espessura menor as bainhas têm características semelhantes as observadas em animais normais e diferem das descritas em outros camundongos geneticamente modificados (KO para Olig1) nos quais os

oligodendrócitos proliferam em resposta ao recrutamento feito pelos axônios mas não mielinizam (BALABANOV & POPKO, 2005). Nesse estudo os autores sugerem que o gene *Olig1*, que codifica o fator de transcrição *Olig1* é essencial para a remielinização mas não para a mielinização. Essa constatação reforça a idéia de que o conjunto de fatores (genéticos e moleculares) que regem a atividade celular de formação e manutenção da mielina deve estar presentes durante toda vida dos animais, para que as fibras consigam desempenhar a função de condução saltatória e eficiente.

Sabe-se que a comunicação através das junções comunicantes com formação de malhas de processos celulares (sincícios) é usada pelos axônios danificados para fins de regeneração (BALICE-GORDON et al., 1998). Do mesmo modo, axônios desprovidos de suas bainhas após intoxicação, neste caso por BE, podem usar as junções para atrair as células gliais, astrócitos e oligodendrócitos e induzir a remielinização. É sugerido de longa data que o axônio inicia o processo de mielinização (e remielinização) recrutando as células mielinizadoras potenciais (GRAÇA, 1988a), no que provavelmente usa a comunicação através de junções para dar início ao processo. Considerando-se que o estímulo indutor inicial para a mielinização/remielinização não foi ainda determinado, a comunicação via conexinas constitui uma possibilidade real.

As observações feitas no nervo ciático dos camundongos KO para Cx32 injetados com BE são muito semelhantes às realizadas após uma injeção no nervo ciático de ratos Wistar (RIET-CORREA et al., 2002) e à observada nos camundongos normais usados neste experimento. Após intoxicação aguda das células de Schwann, representada por edema celular, e a rejeição dos internodos de mielina formados e sustentados pelas células individualmente, os detritos mielínicos resultantes foram retirados por fagócitos mononucleares que invadem as áreas de lesão. A remoção desses detritos e a proliferação das células de Schwann, que reagem rapidamente a estímulos de etiologia variada, neste caso tóxico e traumático (CAVANAGH, 1990), promoveram o reparo das bainhas perdidas, a partir dos sete dias pós-injeção, de modo que aos vinte e um dias os axônios desmielinizados possuíam finas bainhas com compactação evidente. A espessura das bainhas, o número de lamelas e o tamanho do internodo foram sempre menores do que o normal, quando comparados com as bainhas do axônios normais adjacentes, e são indicativos de remielinização (BEUCHE & FRIEDE, 1985).

Nos cortes de nervo ciático de todos os animais estudados, foi conspícua a presença de mastócitos. Essas células são consideradas constituintes normais do tecido. Nas lesões aqui descritas elas estavam presentes no endo, peri e epineuro, sem uma localização exclusiva na

proximidade de vasos sangüíneos. Cavanagh (1990) relata que os mastócitos proliferam em todo e qualquer processo que afete os nervos periféricos. No entanto, o autor não consegue explicar o motivo de tal proliferação e as conseqüências da mesma para o tecido. A presença de mastócitos em lesões de esclerose múltipla (KRUGER et al., 1990) levou os autores a especular sobre os efeitos da presença dessas células na barreira hematoencefálica, o que não pode ser provado. Não foram observados mastócitos nas lesões induzidas por BE no tronco encefálico de ratos e camundongos o que sugere que essas células podem estar presentes nesse tecido em circunstâncias muito especiais, i.é, quando as modificações decorrentes de degeneração e da reação imune-inflamatória são marcadas, como na esclerose múltipla (BROSNAN & RAINE, 1996).

O fato dos mastócitos nas lesões induzidas pelo brometo de etídio terem sido observados como orto ou como metacromáticos, desgranulados ou não, pode indicar que eles participam da resposta celular geral à agressão traumática ou traumático-tóxica, estimulando a regeneração das bainhas e das fibras. Nas lesões mais tardias (30 dias), eles adotam uma atitude quiescente (ortocromáticos não desgranulados).

As bainhas reparadas tinham numerosas alças redundantes (*tomacula*), o que é consistentemente relatado desde os animais inferiores (CULLEN & WEBSTER, 1979) e foi descrito na remielinização após injeção de BE no nervo ciático de ratos Wistar (RIET-CORREA et al., 2002). As *tomacula* são relatadas como estruturas proeminentes das bainhas periféricas em várias doenças e em modelos experimentais onde há mutação dos genes que codificam proteínas da mielina (RUNKER et al., 2004). São consideradas como hipermielinização, tanto nos processos geneticamente determinados como na remielinização após desmielinização, espontânea ou induzida. A capacidade de regeneração das fibras nervosas periféricas ou somente da mielina é notória no SNP (GRAÇA, 2003) e caracteriza a relação estreita e interdependente entre as fibras e a matriz extracelular. Após a regeneração, as fibras ou as bainhas sofrem remodelação ao longo do tempo; essa remodelação que culmina com a presença de pouco ou nenhum excesso de mielina para a célula de Schwann sustentar, é relatada como incompleta e falha nos animais com defeitos genéticos da mielina, que têm dificuldade mesmo de mielinizar suas fibras adequadamente (RUNKER et al., 2004). Uma metodologia alternativa e eficiente para a detecção e mensuração das alterações das fibras é a das fibras desfiadas, usada para o estudo de degeneração walleriana e de desmielinização segmentar de fibras periféricas (SOUZA et al., 1996). A individualização das fibras facilita a observação morfológica e os estudos morfométricos.

Não foi observada a formação de *onion bulbs*, característicos da CMT1X e dos camundongos KO para Cx32 após os 4-6 meses de vida (ANZINI et al., 1997), bem como de modelos experimentais de desmielinização tóxica do SNP (HALL, 1983). Os *onion bulbs* consistem da ocorrência de células de Schwann supranumerárias dispostas de forma concêntrica ao redor dos axônios, com bainha ou sem ela, intercaladas com profusa deposição de fibras colágenas. Essas formações ocorrem pela comunicação irregular entre o axônio e a célula de Schwann; essa falha de comunicação nos camundongos KO deste estudo é de ocorrência tardia, após os 4-6 meses de idade, momento em que são relatadas essas formações (ANZINI et al., 1997). Essa observação nos leva a pensar que as moléculas que ativam os genes que codificam a Cx32 ocorrem em quantidade finita nesses animais e que, os mecanismos alternativos para a manutenção da mielina não estão disponíveis após os 4-6 meses de idade quando, de um modo geral, os tecidos sofrem um decaimento natural em animais de vida curta. Por exemplo, a presença aumentada de TGF $\beta$ 2, detectada em camundongos KO para Cx32 (KARDAMI et al., 2007), seria suficiente para a mielinização e a manutenção da mielina em animais jovens; entretanto mudanças no relógio biológico (DURAND & RAFF, 2000) das células envolvidas no processo determinaria a perda da função nos processos de reparo.

Ainda, a conformação normal das bainhas dos camundongos KO não inoculados e as bainhas reparadas dos KO após a injeção do BE difere da relatada em outros modelos deficientes na expressão de proteínas envolvidas na mielinização periférica como a P<sub>0</sub>, PMP22 e MAG (ANZINI et al., 1997). Nesses modelos a mielinização está gravemente comprometida (dismielinização) e há desmielinização progressiva das bainhas mal formadas, o que não ocorre nos camundongos KO usados neste estudo, que somente apresentariam alterações da mielinização/remielinização após a maturidade (4-6 meses de idade).

Os achados acima indicam que a ausência de Cx32 não muda o padrão de remielinização no SNP, ao menos até a idade e tempo pós-injeção observados nos camundongos KO. Pode-se especular, ora que ela não é tão crítica para o processo como suposto anteriormente, ou que outras proteínas, consideradas de menor atuação, são expressas para suprir a deficiência da Cx32; as candidatas mais prováveis seriam a Cx46 e a Cx43. A Cx46 somente foi demonstrada em células de Schwann desnervadas, o que não impede que possa ocorrer em células de Schwann mielinizantes, enquanto que a Cx43 (comprovadamente expressa nos camundongos deste estudo, expressão observada através de IF), ainda não foi localizada em regiões paranodais e incisuras de Schmidt-Lantermann das fibras periféricas (BALICE-GORDON et al., 1998).

Alternativamente, nos indivíduos muito jovens, no período de mielinização periférica, o mRNA para a Cx32 é pouco detectado, enquanto que o mRNA da Cx29 é conspicuo. Tal relação entre essas duas conexinas é invertida após degeneração/regeneração (SCHERER & PAUL, 2004). Assim, a Cx29 poderia ser expressa no nervo ciático dos camundongos KO após a desmielinização induzida por BE, o que garantiu que a remielinização obedecesse a um padrão clássico.

Apesar da abundante literatura sobre as conexinas e a comunicação celular para vias de proliferação, diferenciação e função celulares, resta-nos comprovar *in vivo* a real participação de cada conexina nos processos fisiológicos e patológicos estudados. No modelo aqui apresentado, duas observações decorrentes das lesões são importantes: a ausência de células de Schwann na remielinização dos axônios demielinizados na ponte e a remielinização do tipo padrão para o modelo do BE no SNP. A Cx32 é expressa na mielina e nas células mielinizantes, tanto no SNC quanto no SNP. O *timing* do reparo das bainhas no SNC segue o padrão do realizado por oligodendrócitos; a remielinização mais rápida é a realizada por células de Schwann que invadem o tecido a partir da periferia dos vasos sanguíneos e espaços subpiaais a partir dos sete dias pós-injeção do BE (GRAÇA, 1989b) fato que não foi observado neste estudo.

Em relação ao SNP, o comportamento mostrado pelas células de Schwann é compatível com o de uma célula derivada da crista neural, com enorme potencialidade para situações emergenciais, i.é, secreção de colágeno para remielinizar no SNC onde esse elemento não existe (considerado o terceiro elemento para a mielinização e a remielinização no SNP; os outros são o axônio e a célula de Schwann) (GRAÇA, 1989b). Seja através da formação de conexons constituídos por outras conexinas, seja através de procedimentos ainda não suspeitados, a célula de Schwann remieliniza os internodos periféricos perdidos após a intoxicação pelo BE nos camundongos KO para Cx32. Resta-nos descobrir o mecanismo que impediu a entrada dessas células no SNC: se é baseado na ausência da Cx32 (o que não impediu o reparo no SNP nestes animais jovens), ou no tamanho pequeno das lesões com pouca destruição de astrócitos, ou ainda algum mecanismo que precisa ser descoberto.

Os achados no SNC e no SNP indicam que a pesquisa que envolve animais KO para conexinas constitui uma excelente complementação dos experimentos relativos ao modelo do BE realizados até o momento. Muitas questões requerem maiores esclarecimentos que, ao que os estudos sugerem, somente serão obtidos a partir de estudos moleculares.



## CONCLUSÕES

A injeção de 5  $\mu$ l de 0,1% BE no tronco encefálico de camundongos C57BL-6 KO para Cx32 induziu lesões desmielinizantes que remielinizaram por oligodendrócitos a partir da periferia, onde os processos astrocitários eram conspícuos. Não foi observada a presença de células de Schwann na fase de reparo das lesões.

A injeção de 1  $\mu$ l de 0,1% BE no nervo ciático de camundongos C57BL-6 KO para Cx32 induziu lesões desmielinizantes que remielinizaram com o padrão e o *timing* relatado em camundongos normais. Nos camundongos normais, a presença de células de Schwann é rara.

A metodologia utilizada neste estudo mostrou ser adequada para cada fase: PCR e IF para demonstração da ausência de Cx32; IF para demonstração da Cx43 nos astrócitos reativos; histoquímica, imunoistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão para o acompanhamento morfológico das lesões.

O uso de animais KO para proteínas que participam da comunicação entre axônios e células gliais permitiu observar uma resposta inflamatória diferenciada importante no SNC, um tecido com privilégio imunológico, sinalizando para novas linhas de investigação.

## REFERÊNCIAS

ALDSKOGIUS, H.; KOZLOVA, E.N. Central neuron-glia and glial-glia interactions following axon injury. *Prog.Neurobiol.*, v.55, n.1, p.1-26, 1998.

ALTEVOGT, B.M.; PAUL, D.L. Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J Neurosci.*, v.24, n.18, p.4313-4323, 2004.

ANDRADE-ROZENTAL, A.F. et al. Gap junctions: the "kiss of death" and the "kiss of life". *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.32, n.1, p.308-315, 2000.

ANZINI, P. et al. Structural abnormalities and deficient maintenance of peripheral nerve myelin in mice lacking the gap junction protein connexin 32. *J.Neurosci.*, v.17, n.12, p.4545-4551, 1997.

BALABANOV, R.; POPKO, B. Myelin repair: developmental myelination redux? *Nat.Neurosci.*, v.8, n.3, p.262-264, 2005.

BALICE-GORDON, R.J.; BONE, L.J.; SCHERER, S.S. Functional gap junctions in the schwann cell myelin sheath. *J.Cell Biol.*, v.142, n.4, p.1095-1104, 1998.

BANKS, W.J. **Applied veterinary histology**: St. Louis ; London : Mosby Year Book. 3rd ed ed., 1992,

BARON-VAN EVERCOOREN, A.; BLAKEMORE, W.F. Remyelination through Engraftment. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 6, p. 143-172.

BECKER, D.; GREEN, C. Gap junction-mediated interactions between cells. In: FLEMING, T.P. **Cell-cell interactions a practical approach**. 2nd ed ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. cap. 3, p. 47-70.

BEHAR, T.N. Analysis of fractal dimension of O2A glial cells differentiating in vitro. *Methods*, v.24, n.4, p.331-339, 2001.

BEUCHE, W.; FRIEDE, R.L. A new approach toward analyzing peripheral nerve fiber populations. II. Foreshortening of regenerated internodes corresponds to reduced sheath thickness. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.*, v.44, n.1, p.73-84, 1985.

BIGNAMI, A.; DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury**: Austin : R.G. Landes. 1994,

BLAKEMORE, W.F. Remyelination by Schwann cells of axons demyelinated by intraspinal injection of 6-aminonicotinamide in the rat. *J.Neurocytol.*, v.4, n.6, p.745-757, 1975.

BLANC, E.M.; BRUCE-KELLER, A.J.; MATTSON, M.P. Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cell death. *J.Neurochem.*, v.70, n.3, p.958-970, 1998.

BONDAN, E.F. et al. [Ultrastructural study of the remyelinating process following local ethidium bromide injection in the brainstem of dexamethasone-immunosuppressed rats]. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.62, n.1, p.131-138, 2004.

BONDAN, E.F. et al. [Investigation into the astrocytic immunoreactivity to GFAP and vimentin in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model]. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.61, n.3A, p.642-649, 2003.

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; GRAÇA, D.L. Efeitos do brometo de etídio no tronco encefálico de ratos Wistar imunossuprimidos com ciclosporina. *Cadernos De Estudos e Pesquisas UNIP*, v.4, n.1-46, 1998.

BONDAN, E.F. et al. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.*, v.32, n.4, p.603-612, 2000.

BONDAN, E.F. et al. Delayed Schwann cell and oligodendrocyte remyelination after ethidium bromide injection in the brainstem of Wistar rats submitted to streptozotocin diabetogenic treatment. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v.39, n.5, p.637-646, 2006.

BRAND-SCHIEBER, E. et al. Connexin43, the major gap junction protein of astrocytes, is down-regulated in inflamed white matter in an animal model of multiple sclerosis. *J Neurosci.Res.*, v.80, n.6, p.798-808, 2005.

BROSNAN, C.F.; RAINE, C.S. Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathol.*, v.6, n.3, p.243-257, 1996.

BUSSOW, H. Schwann cell myelin ensheathing C.N.S. axons in the nerve fibre layer of the cat retina. *J.Neurocytol.*, v.7, n.2, p.207-214, 1978.

CAMPOS DE CARVALHO, A.C. et al. Gap junction disappearance in astrocytes and leptomeningeal cells as a consequence of protozoan infection. *Brain Res.*, v.790, n.1-2, p.304-314, 1998.

CAVANAGH, J.B. Reactions of neurons and Schwann cells to injury. In: WELLER, R. **Nervous system, muscle and eyes**. 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1990. cap. 19, p. 533-543.

CEREIJIDO, M.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R.G. Functional analysis of the tight junction. In: FLEMING, T.P. **Cell-cell interactions a practical approach**. 2nd ed ed. Oxford: Oxford University Press, 2002. cap. 4, p. 71-92.

CHANDROSS, K.J. et al. Altered connexin expression after peripheral nerve injury. *Mol.Cell Neurosci.*, v.7, n.6, p.501-518, 1996a.

CHANDROSS, K.J. et al. TNF alpha inhibits Schwann cell proliferation, connexin46 expression, and gap junctional communication. *Mol.Cell Neurosci.*, v.7, n.6, p.479-500, 1996b.

CONTRERAS, J.E. et al. Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.47, n.1-3, p.290-303, 2004.

CULLEN, M.J.; WEBSTER, H.D. Remodelling of optic nerve myelin sheaths and axons during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *J.Comp Neurol.*, v.184, n.2, p.353-362, 1979.

DERMIETZEL, R. Gap junction wiring: a 'new' principle in cell-to-cell communication in the nervous system? *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.26, n.2-3, p.176-183, 1998.

DERMIETZEL, R. et al. Oligodendrocytes express gap junction proteins connexin32 and connexin45. *Glia*, v.20, n.2, p.101-114, 1997.

DERMIETZEL, R. et al. Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.32, n.1, p.45-56, 2000.

DERMIETZEL, R.; SPRAY, D.C. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci.*, v.16, n.5, p.186-192, 1993.

DERMIETZEL, R.; SPRAY, D.C. From neuro-glue ('Nervenkit') to glia: a prologue. *Glia*, v.24, n.1, p.1-7, 1998.

DERMIETZEL, R. et al. Differential expression of three gap junction proteins in developing and mature brain tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v.86, n.24, p.10148-10152, 1989.

DOBRENIS, K. et al. Human and mouse microglia express connexin36, and functional gap junctions are formed between rodent microglia and neurons. *J Neurosci.Res.*, v.82, n.3, p.306-315, 2005.

DURAND, B.; RAFF, M. A cell-intrinsic timer that operates during oligodendrocyte development. *Bioessays*, v.22, n.1, p.64-71, 2000.

EDENFELD, G.; STORK, T.; KLAMBT, C. Neuron-glia interaction in the insect nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, v.15, n.1, p.34-39, 2005.

ESEN, N. et al. Modulation of connexin expression and gap junction communication in astrocytes by the gram-positive bacterium *S. aureus*. *Glia*, v.55, n.1, p.104-117, 2007.

EUGENIN, E.A. et al. Microglia at brain stab wounds express connexin 43 and in vitro form functional gap junctions after treatment with interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v.98, n.7, p.4190-4195, 2001.

FARAHANI, R. et al. Alterations in metabolism and gap junction expression may determine the role of astrocytes as "good samaritans" or executioners. *Glia*, v.50, n.4, p.351-361, 2005.

FERNANDES, C.G.; GRAÇA, D.L.; PEREIRA, L.A.V.D. Desmielinização e Remielinização após Múltiplas Injeções Intramedulares de Brometo de Etídio em Ratos wistar. *Arq.Neuropsiquiatr.*, v.55, n.3-A, p.452-459, 1997.

FILBIN, M.T. Myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the adult mammalian CNS. *Nat.Rev.Neurosci.*, v.4, n.9, p.703-713, 2003.

FRANKLIN, R.J.M.; GOLDMAN, J.E. Remyelination by Endogenous Glia. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 7, p. 173-196.

FULLER, G.N.; BURGER, P.C. Central Nervous System. In: STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**. 2nd ed ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. cap. 11, p. 243-282.

GARG, S.; MD, S.M.; KIELIAN, T. *Staphylococcus aureus*-derived peptidoglycan induces Cx43 expression and functional gap junction intercellular communication in microglia. *J Neurochem.*, v.95, n.2, p.475-483, 2005.

GILSON, J.; BLAKEMORE, W.F. Failure of remyelination in areas of demyelination produced in the spinal cord of old rats. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, v.19, n.2, p.173-181, 1993.

GOW, A. The Claudin 11 Gene. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 22, p. 565-578.

GRAÇA, D.L. Mielinização, Desmielinização e Remielinização no Sistema Nervoso Central. *Arq.Neuro-Psiquiat.*, v.46, n.3, p.292-297, 1988a.

GRAÇA, D.L. Desmielinização Tóxica do Sistema Nervoso Central I. Ação de uma Droga Intercalante Gliotóxica na Medula Espinhal de Ratos Wistar. *Arq.Neuro-Psiquiat.*, v.47, n.3, p.263-267, 1989a.

GRAÇA, D.L. Desmielinização Tóxica do Sistema Nervoso Central II. Aspectos Biológicos das Células de Schwann Observados Durante o Processo de Reparação do Tecido. *Arq.Neuro-Psiquiat.*, v.47, n.3, p.268-273, 1989b.

GRAÇA, D.L. The presence of lymphocytes in a toxically induced demyelinating process of the central nervous system. *Microsc.Electron Biol.Celular*, v.12, n.1, p.17-21, 1988b.

GRAÇA, D.L. Reparação do sistema nervoso: modelos experimentais. In: ANAIS DO 24 CONGRESSO BRASILEIRO DE PATOLOGIA, 24, 2003, Florianópolis, 2003. p.

GRAÇA, D.L. **Investigation into ethidium bromide demyelination in the central nervous system** 1986. Thesis (PhD) - University of Cambridge, 1986.

GRAÇA, D.L.; BLAKEMORE, W.F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.*, v.12, n.6, p.593-605, 1986.

HALL, S.M. The response of the (myelinating) Schwann cell population to multiple episodes of demyelination. *J.Neurocytol.*, v.12, n.1, p.1-12, 1983.

HINKEROHE, D. et al. Effects of cytokines on microglial phenotypes and astroglial coupling in an inflammatory coculture model. *Glia*, v.52, n.2, p.85-97, 2005.

IACOBAS, D.A.; SCEMES, E.; SPRAY, D.C. Gene expression alterations in connexin null mice extend beyond the gap junction. *Neurochem.Int.*, v.45, n.2-3, p.243-250, 2004.

JACOBS, J.R. The Midline Glia of *Drosophila*: a molecular genetic model for the developmental functions of Glia. *Progress in Neurobiology*, v.62, n.5, p.475-508, 2000.

JESSEN, K.R.; MIRSKY, R. Schwann Cell Development. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 13, p. 329-370.

KAMASAWA, N. et al. Connexin-47 and connexin-32 in gap junctions of oligodendrocyte somata, myelin sheaths, paranodal loops and Schmidt-Lanterman incisures: implications for ionic homeostasis and potassium siphoning. *Neuroscience*, v.136, n.1, p.65-86, 2005.

KARDAMI, E. et al. The role of connexins in controlling cell growth and gene expression. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, v.94, n.1-2, p.245-264, 2007.

KIELIAN, T.; ESEN, N. Effects of neuroinflammation on glia-glia gap junctional intercellular communication: a perspective. *Neurochem.Int.*, v.45, n.2-3, p.429-436, 2004.

KOBSAR, I. et al. Macrophage-related demyelination in peripheral nerves of mice deficient in the gap junction protein connexin 32. *Neurosci.Lett.*, v.320, n.1-2, p.17-20, 2002.

KRUGER, P.G. et al. Mast cells and multiple sclerosis: a light and electron microscopic study of mast cells in multiple sclerosis emphasizing staining procedures. *Acta Neurol.Scand.*, v.81, n.1, p.31-36, 1990.

LEE, I.H. et al. Glial and neuronal connexin expression patterns in the rat spinal cord during development and following injury. *J Comp Neurol*, v.489, n.1, p.1-10, 2005.

LI, W.; HERTZBERG, E.L.; SPRAY, D.C. Regulation of connexin43-protein binding in astrocytes in response to chemical ischemia/hypoxia. *J.Biol.Chem.*, v.280, n.9, p.7941-7948, 2005.

LI, X. et al. Connexin47, connexin29 and connexin32 co-expression in oligodendrocytes and Cx47 association with zonula occludens-1 (ZO-1) in mouse brain. *Neuroscience*, v.126, n.3, p.611-630, 2004.

LIN, J.H. et al. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat.Neurosci.*, v.1, n.6, p.494-500, 1998.

LYNN, B.D.; MAROTTA, C.A.; NAGY, J.I. Propagation of Intercellular Calcium Waves in Pc12 Cells Overexpressing A Carboxy-Terminal Fragment of Amyloid Precursor Protein. *Neuroscience Letters*, v.199, n.1, p.21-24, 1995.

MAZZANTI, C.M. et al. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Int.J.Dev.Neurosci.*, v.25, n.4, p.259-264, 2007.

MAZZANTI, C.M. et al. Acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide and treated with interferon beta. *Neurochem.Res.*, v.31, n.8, p.1027-1034, 2006.

MILLER, R.; REYNOLDS, R. Oligodendroglial Lineage. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 11, p. 289-310.

MIRAGALL, F. et al. Expression of Connexins in the Developing Olfactory System of the Mouse. *Journal of Comparative Neurology*, v.325, n.3, p.359-378, 1992.

MORITA, K. et al. Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J.Cell Biol.*, v.145, n.3, p.579-588, 1999.

NAGY, J.I.; DUDEK, F.E.; RASH, J.E. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.47, n.1-3, p.191-215, 2004.

NAGY, J.I. et al. Induction of connexin43 and gap junctional communication in PC12 cells overexpressing the carboxy terminal region of amyloid precursor protein. *Journal of Neuroscience Research*, v.44, n.2, p.124-132, 1996a.

NAGY, J.I. et al. Connexin29 and connexin32 at oligodendrocyte and astrocyte gap junctions and in myelin of the mouse central nervous system. *J.Comp Neurol.*, v.464, n.3, p.356-370, 2003.

NAGY, J.I. et al. Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Brain Research*, v.717, n.1-2, p.173-178, 1996b.

NAGY, J.I.; RASH, J.E. Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.32, n.1, p.29-44, 2000.

NAKASE, T.; NAUS, C.C. Gap junctions and neurological disorders of the central nervous system. *Biochim.Biophys.Acta*, v.1662, n.1-2, p.149-158, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL **Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**: Washington D.C.: National Academic Press. 1996, 125p.

NEWMAN, E.A. High Potassium Conductance in Astrocyte Endfeet. *Science*, v.233, n.4762, p.453-454, 1986.



OGURO, K. et al. Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *J.Neurosci.*, v.21, n.19, p.7534-7542, 2001.

ORSINO, A.; TAYLOR, C.V.; LYE, S.J. Connexin-26 and connexin-43 are differentially expressed and regulated in the rat myometrium throughout late pregnancy and with the onset of labor. *Endocrinology*, v.137, n.5, p.1545-1553, 1996.

ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R.O. Peripheral Nervous System. In: STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**. 2nd ed ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. cap. 12, p. 285-311.

PEREIRA, L.A. et al. Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide. *J.Submicrosc.Cytol.Pathol.*, v.30, n.3, p.341-348, 1998.

PITT, D.; WERNER, P.; RAINE, C.S. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat.Med.*, v.6, n.1, p.67-70, 2000.

RAMOS, A.T.; GRAÇA, D.L. O modelo desmielinizante do brometo de etídio (BE): estudos morfológicos em camundongos c57bl/6 normais e knockout para conexina 32 (Projeto de pesquisa CNPq :305756/2-6). 2006.

RASH, J.E. et al. Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin-36 but not connexin-32 or connexin-43. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v.97, n.13, p.7573-7578, 2000.

RASH, J.E.; YASUMURA, T. Direct immunogold labeling of connexins and aquaporin-4 in freeze-fracture replicas of liver, brain, and spinal cord: factors limiting quantitative analysis. *Cell and Tissue Research*, v.296, n.2, p.307-321, 1999.

RASH, J.E. et al. Cell-specific expression of connexins and evidence of restricted gap junctional coupling between glial cells and between neurons. *J.Neurosci.*, v.21, n.6, p.1983-2000, 2001.

RIET-CORREA, G. **Morfologia das lesões induzidas pelo brometo de etídio no nervo ciático de ratos Wistar**2001. 57f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2001.

RIET-CORREA, G. et al. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.*, v.35, n.1, p.99-104, 2002.

RIVAL, T. et al. Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the Drosophila brain. *Current Biology*, v.14, n.7, p.599-605, 2004.

ROSCOE, W.A.; KIDDER, G.M.; KARLIK, S.J. Experimental allergic encephalomyelitis in connexin 43-heterozygous mice. *Cell Commun.Adhes.*, v.14, n.2-3, p.57-73, 2007a.

ROSCOE, W.A. et al. Connexin 43 gap junction proteins are up-regulated in remyelinating spinal cord. *J.Neurosci.Res.*, v.85, n.5, p.945-953, 2007b.

ROZENTAL, R.; CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; SPRAY, D.C. Nervous system diseases involving gap junctions. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.32, n.1, p.189-191, 2000a.

ROZENTAL, R.; GIAUME, C.; SPRAY, D.C. Gap junctions in the nervous system. *Brain Res.Brain Res.Rev.*, v.32, n.1, p.11-15, 2000b.

RUNKER, A.E. et al. Pathology of a mouse mutation in peripheral myelin protein P<sub>0</sub> is characteristic of a severe and early onset form of human Charcot-Marie-Tooth type 1B disorder. *J.Cell Biol.*, v.165, n.4, p.565-573, 2004.

SALLIS, E.S. et al. OSP-Immunofluorescent remyelinating oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.64, n.2A, p.240-244, 2006.

SANCHEZ, M. et al. [Immunohistochemical staining of the macrophagic and astrocytic response in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model and treated with cyclophosphamide]. *Arq Neuropsiquiatr.*, v.64, n.3B, p.787-793, 2006.

SAWAMURA, S. et al. The bipotential glial progenitor cell line can develop into both oligodendrocytes and astrocytes in the mouse forebrain. *Neurosci.Lett.*, v.188, n.1, p.1-4, 1995.

SCEMES, E.; DERMIETZEL, R.; SPRAY, D.C. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia*, v.24, n.1, p.65-73, 1998.

SCHERER, S.S. et al. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J.Neurosci.*, v.15, n.12, p.8281-8294, 1995.

SCHERER, S.S.; PAUL, D.L. The Connexin32 and Connexin29 Genes. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin biology and disorders**. 1 ed. San Diego: Elsevier academic Press, 2004. cap. 24, p. 599-608.

SCHILLING, T. et al. Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K<sup>+</sup> channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *Eur.J Neurosci.*, v.14, n.3, p.463-473, 2001.

SEPP, K.J.; SCHULTE, J.; AULD, V.J. Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Developmental Biology*, v.238, n.1, p.47-63, 2001.

SILVER, J.; MILLER, J.H. Regeneration beyond the glial scar. *Nat.Rev.Neurosci.*, v.5, n.2, p.146-156, 2004.

SOHL, G.; MAXEINER, S.; WILLECKE, K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat.Rev.Neurosci.*, v.6, n.3, p.191-200, 2005.

SOHL, G. et al. New insights into the expression and function of neural connexins with transgenic mouse mutants. *Brain Res Brain Res Rev.*, v.47, n.1-3, p.245-259, 2004.

SOROCEANU, L.; MANNING, T.J., JR.; SONTHEIMER, H. Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia*, v.33, n.2, p.107-117, 2001.

SOUZA, M.V. et al. Regeneration of peripheral nerve fibres following haloxon induced degeneration. *Braz.J.Vet.Res.Anim.Sci.*, v.33, n.4, p.231-234, 1996.

SPRAY, D.C.; DERMIETZEL, R. X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease and other potential gap-junction diseases of the nervous system. *Trends Neurosci.*, v.18, n.6, p.256-262, 1995.

STOUT, C.; GOODENOUGH, D.A.; PAUL, D.L. Connexins: functions without junctions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, v.16, n.5, p.507-512, 2004.

SUADICANI, S.O. et al. Acute downregulation of Cx43 alters P2Y receptor expression levels in mouse spinal cord astrocytes. *Glia*, v.42, n.2, p.160-171, 2003.

SUTOR, B. et al. Myelination defects and neuronal hyperexcitability in the neocortex of connexin 32-deficient mice. *Cereb.Cortex*, v.10, n.7, p.684-697, 2000.

TIWARI-WOODRUFF, S.K. et al. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *J.Cell Biol.*, v.153, n.2, p.295-305, 2001.

TRAPP, B.D.; KIDD, G.J. Structure of the Myelinated Axon. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 1, p. 3-27.

TRAPP, B.D. et al. Cell Biology of Myelin Assembly. In: LAZZARINI, R.A. **Myelin Biology and Disorders**. 1st ed. Sand Diego, Calif: Elsevier Academic Press, 2004. cap. 2, p. 29-55.

WILLECKE, K. et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol.Chem.*, v.383, n.5, p.725-737, 2002.

WOLBURG, H. et al. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neuroscience Letters*, v.307, n.2, p.77-80, 2001.

WOLFF, J.R. et al. Autocellular coupling by gap junctions in cultured astrocytes: A new view on cellular autoregulation during process formation. *Glia*, v.24, n.1, p.121-140, 1998.

**APÊNDICE A- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA GENOTIPAGEM DE ANIMAIS KNOCKOUT DO LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL - FMVZ – USP.**

1. Coleta da cauda dos camundongos:

Desinfetar a tesoura que será usada em álcool iodado (antes de utiliza-la e entre um animal e outro);

Cortar as caudas dos camundongos com um tamanho aproximadamente de 0,5 cm na diagonal;

Identificar com papel interno, numerando à lápis;

Embrulhar em papel alumínio;

Armazenar em nitrogênio líquido imediatamente (garrafa térmica);

Conservar a -80°C até análise.

2. Extração do DNA

Identificar os tubos eppendorf e preparar a solução;

Macerar a cauda ou tecido com martelo em placa metálica no gelo;

Colocar a cauda ou tecido macerado em um eppendorf contendo 200µl de tampão de lise com proteinase K (50µl de proteinase K para 3ml de tampão)

Incubar durante 2 horas em banho-maria a 65°C ou over-night a 37°C (estufa);

Adicionar 200µl de tampão de lise (sem proteinase K) - homogeneizar;

Incubar 15 minutos em temperatura ambiente;

Centrifugar durante 20 minutos a 10000 r.p.m. a 4°C;

Transferir o sobrenadante para um novo tubo (aspirar cerca de 250µl com a ponteira - não pegar a interfase nem o precipitado, observar a figura 1);

Adicionar 2x o volume do sobrenadante de etanol 100% gelado;

Adicionar 10% do volume do sobrenadante de acetato de sódio 3M gelado - manter os tubos no gelo;

Homogeneizar até aparecer a medusa;

Centrifugar durante 10 minutos a 6000 r.p.m. a 4°C - desprezar o sobrenadante por inversão;

Adicionar 500µl de etanol 70% para remover o sal que está em excesso (isso facilitará a solubilização do pelete);

Centrifugar durante 10 minutos a 6000 r.p.m. a 4°C - desprezar o sobrenadante por inversão;

Deixar os tubos invertidos para tirar o excesso do etanol e secar o pelete na própria bancada;

Ressuspender o pellet em TE (Tris/EDTA) - (quantidade proporcional ao tamanho do pellet);

Incubar as amostras no banho a 65°C durante 30 minutos para facilitar a solubilização do pelete;

Homogeneizar e guardar em geladeira para quantificar;

No momento da quantificação, repetir a etapa de incubação acima, se necessário.

3. Quantificação da concentração e determinação da razão A260/280:

Para a quantificação do DNA, este deve ser diluído na proporção de 5µl de DNA em 95 µl (1:20) em TE;

Ler a absorbância no Biofotômetro e anotar a razão (deve estar em torno de 1,8) e a concentração;

Diluir as amostras para 100ng/µl com TE para a elaboração da reação de PCR;

Fazer a PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

PCR para Cx 32:

Camundongos podem ser homozigoto (knockout), heterozigotos ou normais.

| MIX                         | Quantidade    |
|-----------------------------|---------------|
| DNA (50 - 100ng/ $\mu$ l)   | 1 - 2 $\mu$ l |
| Tampão (10X)                | 2 $\mu$ l     |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM)    | 0,6 $\mu$ l   |
| dNTPs (2,5mM)               | 1,6 $\mu$ l   |
| KO WT NEO (10pMol/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l     |
| KO WT 3 (10pMol/ $\mu$ l)   | 1 $\mu$ l     |
| KO NEO 3 (10pMol/ $\mu$ l)  | 1 $\mu$ l     |
| Taq (5U)                    | 0,2 $\mu$ l   |
| H <sub>2</sub> O            | 11,6 $\mu$ l  |

PCR para Cx 43:

Camundongos heterozigotos ou normais

| MIX                                 | Quantidade    |
|-------------------------------------|---------------|
| DNA (50 - 100ng/ $\mu$ l)           | 1 - 2 $\mu$ l |
| Tampão (10X)                        | 2 $\mu$ l     |
| MgCl <sub>2</sub> (50mM)            | 0,6 $\mu$ l   |
| dNTPs (2,5mM)                       | 1,6 $\mu$ l   |
| Cx. 43 Sense (10pMol/ $\mu$ l)      | 1 $\mu$ l     |
| Cx. 43 Anti-sense (10pMol/ $\mu$ l) | 1 $\mu$ l     |
| NEO Sense (10pMol/ $\mu$ l)         | 1 $\mu$ l     |
| NEO Anti-sense (10pMol/ $\mu$ l)    | 1 $\mu$ l     |
| Taq (5U)                            | 0,2 $\mu$ l   |
| H <sub>2</sub> O                    | 10,6 $\mu$ l  |

Correr um gel de agarose 1 - 2% → usar 1%

*Preparo do gel:* sem brometo de etídio

Pesar 1 - 2g de Agarose

TAE q.s.p. 100ml

Soluções utilizadas

Tampão de Lise:

500µl de Tris-HCl 1M pH = 8,0  
 200µl de EDTA 0,5M pH = 8,0  
 500µl de SDS 10%  
 8,8ml de H<sub>2</sub>O destilada

Proteinase K (20mg/ml):

2,5ml de Tris à 50mM  
 2,5ml de Glicerol

TE (Tris EDTA):

1ml de Tris-HCl 1M pH = 8,0  
 200µl de EDTA 0,5M pH = 8,0  
 H<sub>2</sub>O MilliQ q.s.p. 100ml  
 Verificar se o pH está entre 7,5 e 8,0  
 Autoclavar

TAE (Tris Acetato EDTA):

48,4g de Tris base  
 11,4ml de Acetato de sódio (absoluto)  
 H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada q.s.p. 1000ml

EDTA:

186,1g de Disódio etilenoaminotetra-acetato.2H<sub>2</sub>O.  
 800ml de H<sub>2</sub>O MilliQ autoclavada.  
 Ajustar o pH = 8,0 com NaOH  
 Conservar a temperatura ambiente

“Loading buffer” (BFB) para DNA (10ml) – usado para correr a amostra

0,025g de Azul de bromofenol  
 3ml de Glicerol  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 10ml

Adicionar 2µl de “loading buffer” para cada 10µl de DNA  
 Estocar a 4°C (por tempo indeterminado).

Produto final do PCR é 20µl adicionar 4µl de loading buffer → usar 10µl/well no gel. .

Brometo de Etídeo (Solução Estoque - 10mg/ml)

1g de Brometo de Etídeo  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100ml

Brometo de Etídeo (Solução de Uso - 0,5mg/ml) – para colocar o gel depois da eletroforese

5µl de solução estoque 10mg/ml  
 H<sub>2</sub>O destilada q.s.p. 100ml

100bp DNA ladder - Marcador de peso molecular

50µl de 100bp  
 100µl de “Loading buffer” (BFB)  
 450µl de TE  
 Usar 8µl no well.

## APÊNDICE B – PROTOCOLO DE LUXOL FAST BLUE PARA MIELINA

### TÉCNICA

1. Desparafinizar e hidratar até álcool 95%;
2. Deixar em uma solução de LFB a 50 - 60 °C por 12-24 horas;
3. Lavar em álcool 95% para remover excesso de corante;
4. Lavar em água destilada;
5. Iniciar a diferenciação por uma rápida imersão na solução de carbonato de lítio;
6. Continuar a diferenciação em álcool 70% até que as substância branca e cinzenta fiquem diferenciadas;
7. Lavar em água destilada;
8. Continuar a diferenciação lavando delicadamente em carbonato de lítio e colocar em álcool 70% por várias trocas até que o verde azulado da substância branca contraste novamente com as substância cinzenta incolor;
9. Corar por 3 a 5 minutos com Nuclear Fast Red;
10. Lavar em água destilada;
11. Desidratar e clarificar com xilol;
12. Montar.

### SOLUÇÕES

1. Luxol Fast Blue 0,1%

Luxol fast blue: 0,1g

Álcool etílico 95%: 100ml

Dissolver o corante no álcool; adicionar 0,5ml de ácido acético 10% a cada 100ml de solução. A solução permanece estável por meses.

2. Carbonato de Lítio 0,05%

Carbonato de Lítio: 0,05g

Água destilada: 100ml

3. Solução Nuclear Fast Red 0,1%

Nuclear Fast Red: 0,1g

Sulfato de Alumínio 5%: 100ml

Esfrie, filtre e agregue um grão de timol como conservante.



## **APÊNDICE C – PROTOCOLO DE AZUL DE TOLUIDINA O, DE JONES**

### **TÉCNICA**

1. Desparafinar e hidratar até a água destilada
2. Azul de toluidina 0,1%: 1 a 2min
3. Água destilada: lavar
4. Desidratar, clarificar e montar

### **SOLUÇÃO**

- 1 – Azul de toluidina a 0,1%

## APÊNDICE D – PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA

- 1) Cortes em lâminas silanizadas
- 2) Desparafinização e hidratação:
  - Xilol 20 min (estufa a 60° C)
  - Xilol (morno) 5 min
  - Álcool absoluto – 1 min
  - Álcool 96° - 1 min
  - Álcool 80° - 1 min
  - Álcool 70° - 1 min
- 3) Água corrente por 3 min; água destilada por 1 min
- 4) Peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) – 2x de 10 min (*pingar sobre os cortes individualmente*)
- 5) Lavar em água corrente – 10 min (*se precisar deixar parado mais tempo, por em PBST*)
  - 6) Água destilada – 1 min
  - 7) Leite em pó desnatado a 5% em PBST – 30 min
  - 8) Água corrente – 3 min; água destilada – 1 min
  - 9) PBST por 5 min no mínimo
- 10) Anticorpo primário – pingar o Ac diluído (em diluente de anticorpo ou em PBST) sobre os cortes – incubar na estufa por 2 horas à 37° C em câmara úmida.
  - *Antes de pingar o anticorpo, secar bem com papel absorvente ao redor dos cortes (usar caneta hidrofóbica (PAP-PEN), se necessário).*
- 11) Lavar em PBST - 10 min (2x de 5 min)
- 12) LSAB gotas amarelas (Ac secundário + biotina)
  - pingar quantidade suficiente para cobrir o corte
  - incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente)
- 13) Lavar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador)
- 14) Mergulhar em PBST (2x de 5 min, trocando o PBS)
- 15) LSAB gotas vermelhas (Estreptavidina\_HRP)
  - pingar quantidade suficiente para cobrir o corte
  - incubar por 30-35 min a 25° C (temperatura ambiente)
- 16) Lavar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador)
- 17) Mergulhar em PBS (2x de 5 min; trocando o PBS)
- 18) DAB – preparar conforme instruções anexas
  - em copo plástico no escuro
  - Tempo: 1 a 3 minutos

- 19) Parar a reação em água (copo plástico)
- 20) Água corrente – mínimo 3 min
- 21) Hematoxilina (recém-filtrada) – 1 min
- 22) Lavar em água corrente (até azular)
- 23) Álcool absoluto – rápido
- 24) Álcool absoluto - 1 min
- 25) Álcool absoluto - 1 min
- 26) Xilol 1 (clarificar)
- 27) Xilol 2 (para montar)
- 28) Montar em resina sintética

## APÊNDICE E – PROTOCOLO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

- 1) Cortes em lâminas silanizadas
- 2) Desparafinização e hidratação:
  - Xilol 30 min (estufa a 60° C)
  - Xilol (morno) 5 min
  - Álcool absoluto – 1 min
  - Álcool 96° - 1 min
  - Álcool 80° - 1 min
  - Álcool 70° - 1 min
- 3) Água corrente por 3 min; água destilada por 1 min
- 4) PBST por 5 min, no mínimo
- 5) Anticorpo primário – pingar o Ac diluído (em diluente de anticorpo ou em PBST) sobre os cortes – incubar na estufa overnight em câmara úmida.
  - *Antes de pingar o anticorpo, secar bem com papel absorvente ao redor dos cortes (usar caneta hidrofóbica, se necessário).*
- 6) Lavar em PBST - 10 min (2x de 5 min)
- 7) LSAB gotas amarelas (Ac secundário + biotina)
  - pingar quantidade suficiente para cobrir o corte
  - incubar por 2 horas a 25° C (temperatura ambiente)
- 8) Lavar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador)
- 9) Mergulhar em PBST (2x de 5 min, trocando o PBST)
- 10) Anticorpo FITC (diluição 1:100 em PBST)
  - pingar quantidade suficiente para cobrir o corte
  - incubar por 2 horas a 25° C (temperatura ambiente), no escuro
- 11) Lavar o excesso com PBST (frasco com bico aplicador)
- 12) Mergulhar em PBS (2x de 5 min; trocando o PBS)
- 13) Secar o excesso de líquido
- 14) Montar em meio aquoso (10µl por corte).

## APÊNDICE F – FÓRMULAS DE SOLUÇÕES PARA IMUNOISTOQUÍMICA

- 1) Peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) = ÁGUA OXIGENADA COMERCIAL (10 VOLUMES) – para bloqueio da peroxidase endógena
  
- 2) Clara de ovo + água destilada (para bloquear avidina endógena):
  - Copo de 200 ml de água destilada + 2 claras.
  - Agitar e filtrar o precipitado com gaze;
  
- 3) PBST - pH 7,2 (pode ser entre 7,0 - 7,6)
  - Fosfato de sódio dibásico P.A. ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) – 1,48g
  - Fosfato de potássio monobásico P.A. ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) – 0,43g
  - Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) – 7,20g
  - Água destilada – 1 litro
  - Adicionar 50 microlitros de Tween 20 para cada litro de PBS.
  
- 4) Solução de leite em pó desnatado a 5% em PBST (para bloqueio das ligações inespecíficas)
  - copo de 200 ml: 10g de leite + 200ml de PBST
  
- 5) D.A.B. (Solução reveladora)

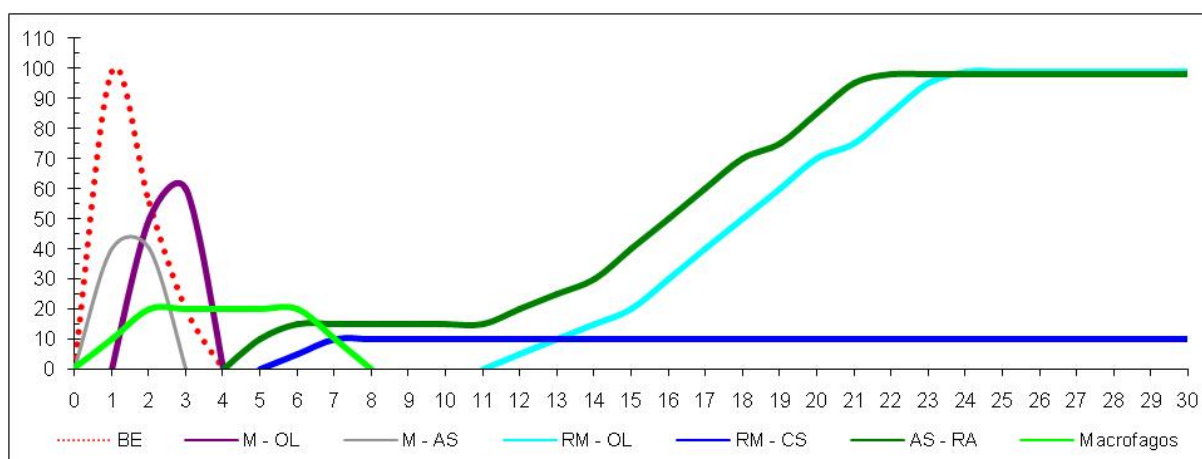
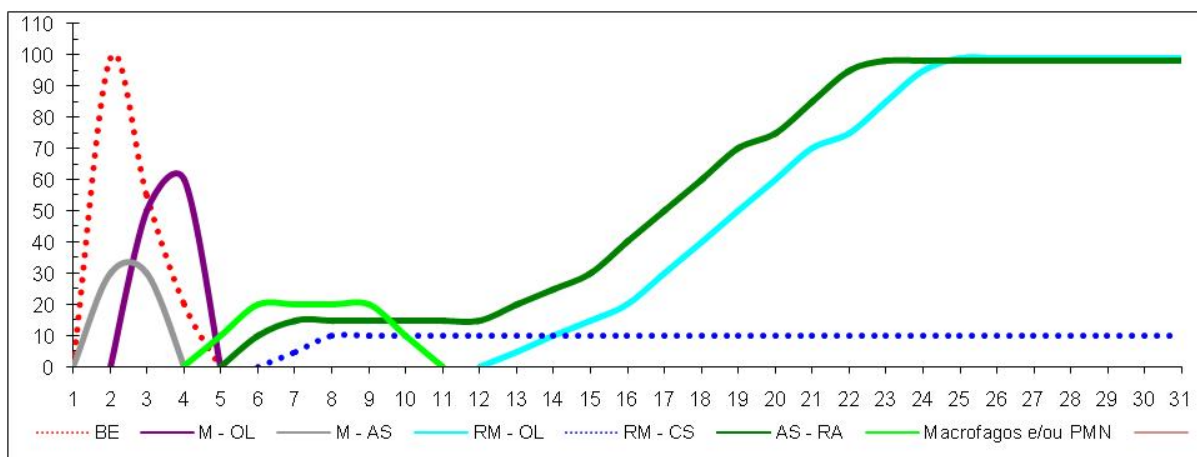
|        |       |       |
|--------|-------|-------|
| D.A.B. | _____ | 72mg  |
| PBS    | _____ | 120ml |

Água Oxigenada 3% \_\_\_\_\_ 1,2ml (adicionar por último)

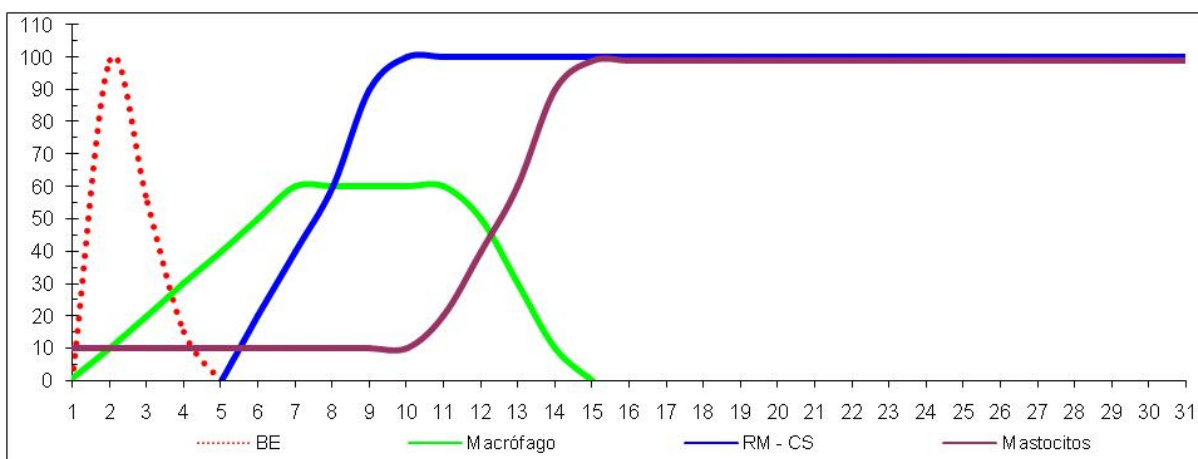
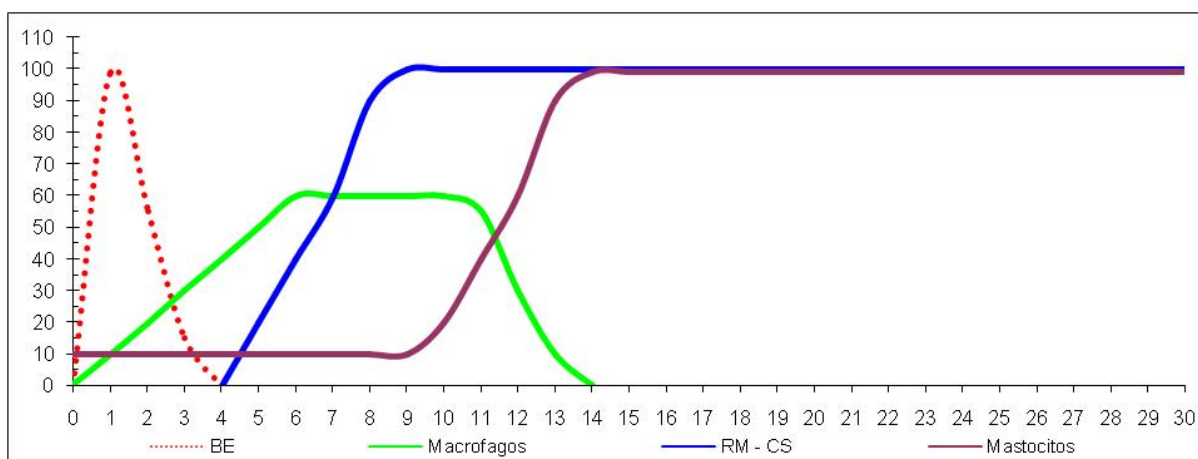
Esta solução deve ser preparada no momento do uso; posteriormente, deve ser desprezada com inativação do D.A.B. pelo hipoclorito de sódio até a solução ficar bem clara.

- O D.A.B. em pó deve ser mantido no FREEZER e manuseado com cuidado (luvas) durante a pesagem e durante a execução do protocolo.

**APÊNDICE G – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS ALTERAÇÕES NO SNC E SNP EM CAMUNDONGOS NORMAIS E KNOCKOUT PARA CONEXINA 32.**



Gráficos demonstrando as alterações fisiopatológicas que ocorrem no SNC de camundongos normais e knockout para Cx32 durante os processos de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio. Legenda: BE: metabolização do BE. M-OL: morte de oligodendrócitos. M-AS: morte de astrócitos. RM-OL: remielinização pelos oligodendrócitos. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. AS-RA: reação astrocitária. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão.



Gráficos demonstrando as alterações físiopatológicas que ocorrem no SNP de camundongos normais e knockout para Cx32 durante os processos de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio. Legenda: BE: metabolização do BE. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão. Mastócitos: presença desse tipo celular na lesão.