

UFSM

Tese de Doutorado

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA E OLIGODENDROGLIAL NO
TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS WISTAR
IMUNOSSUPRIMIDOS E SUBMETIDOS AO MODELO
DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO**

Eliza Simone Viégas Sallis

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2005

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA E OLIGODENDROGLIAL NO
TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS WISTAR
IMUNOSSUPRIMIDOS E SUBMETIDOS AO MODELO
DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO**

por

Eliza Simone Viégas Sallis

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária,
Área de Concentração em Patologia Veterinária, da
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

PPGMV

Santa Maria, RS, Brasil

2005

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**RESPOSTA ASTROCITÁRIA E OLIGODENDROGLIAL NO TRONCO
ENCEFÁLICO DE RATOS WISTAR IMUNOSSUPRIMIDOS E SUBMETIDOS
AO MODELO DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO**

elaborada por

Eliza Simone Viégas Sallis

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dominguita Lühers Graça
(Presidente/Orientador)

Eduardo Fernandes Bondan

Cristina Gevehr Fernandes

Ana Lúcia Schild

Vera Maria Moesch

Santa Maria, 31 de agosto 2005.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** acima de tudo, pela presença constante em todos os momentos de minha vida, me dando muitas graças, força e sabedoria em especial para a realização deste trabalho.

À mãe santíssima, **Maria**, minha grande intercessora, por passar na frente em minha vida.

Ao Jorge Schafhauser Jr, meu esposo, por ter sido companheiro, amigo, amor e principalmente estar ao meu lado, seja qual for o momento.

À minha filha Roberta, grande graça em minha vida.

À minha orientadora e “mãe científica” professora Dominguita Lühers Graça pelo carinho e lições de vida, caráter e exemplo de profissional, que não mediu esforços para ajudar na realização deste trabalho.

Ao Luis Antônio Violin Dias Pereira, da UNICAMP, pelos ensinamentos das técnicas utilizadas no trabalho, e pelo exemplo de pesquisador competente e acima de tudo sua amizade.

À minha amiga, colega de doutorado e profissão, Margarida Buss Raffi, pela sua grande amizade e presença em todos os momentos de minha vida, muito obrigada amiga.

À minha querida amiga Daniela Isabel Brayer Pereira, pelo apoio, carinho e amizade, sempre presente nos momentos importantes de minha vida, me emprestando seu quarto, carro e acima de tudo “torcendo” por mim.

À mana Raquel Rubia Rech, pela sua amizade, ótimo convívio e longas conversas, não medindo esforços para me auxiliar.

Aos professores do Setor de Patologia (UFSM), Claudio Barros, Gláucia Kommers e Luiz Francisco Irigoyen, que me acolheram tão bem, e contribuíram para o meu crescimento profissional. Aos colegas e amigos do Setor de Patologia Veterinária.

Às amigas Ana Lúcia e Glaucia, pelo carinho e estímulo para realização do doutorado.

À Kélen Fabíola Arrotéia, Aline Viott e Adriano Tony Ramos pelo grande auxílio nos experimentos e amizade.

Ao João Nunes pela dedicação e carinho demonstrados na confecção das lâminas histológicas necessárias para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, que não mediram esforços para eu estudar; e minhas irmãs, Maria da Glória e Lélia Maria, pelo apoio incondicional.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Departamento de Patologia desta Universidade, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar o curso de doutorado.

Ao Alexandre Mazzanti do Laboratório de Cirurgia Experimental da UFSM, pela realização das cirurgias com tanta eficiência.

À Cinthia Mazzanti pelos cuidados com os animais e auxílio na aplicação de fármacos, mas principalmente pela sua amizade.

Aos professores, funcionários e pós graduandos do Laboratório de Embriologia e Histologia da UNICAMP, pelas oportunidades de convívio, aprendizado e auxílio constante.

Ao Amilton Valandro Marçal por acreditar em meu potencial e se dedicar muito para minha liberação da PUC.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Células gliais.....	03
2.2 Mielinização.....	10
2.3 Desmielinização.....	11
2.4 Remielinização.....	16
2.5 Brometo de etídio.....	19
2.6 Evolução do modelo experimental do BE no sistema nervoso.....	19
3. TRABALHO 1.....	24
4. TRABALHO 2.....	39
5. DISCUSSÃO GERAL.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1A-** Astrócito na substância branca da medula espinhal: (N) núcleo; (nu) nucléolo; (f) filamento glial; (m) mitocôndria; (rER) retículo endoplasmático rugoso. 10750x (De: Graça, 1986).....06
- FIGURA 1B-** Oligodendrócito interfascicular na substância branca da medula espinhal: (N) núcleo; (g) complexo de Golgi; (m) mitocôndria; (mt) microtúbulos; (ax) axônio mielinizado. 10750x (De: Graça, 1986).....06
- FIGURA 1C-** Micróglia na substância branca da medula espinhal: (n) núcleo grande e alongado; (db) citoplasma eletrolucente com corpo denso. 10750x (De: Graça, 1986)..12
- FIGURA 2-** Oligodendrócito estende seus processos para formar os internodos de mielina de vários axônios (N: nodo de Ranvier).....12
- FIGURA 3-** Lesão de 120 dias na coluna ventral. A área de remielinização central (c) é extensa e a área de remielinização periférica (p) é limitada a poucas fileiras sob a superfície pial. X250 (De: Graça, 1986).....17

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Marcadores da linhagem de oligodendrócitos.....	09
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

a.i.- *after injection*

A2B5- anticorpo monoclonal a polisialogangliosídios

AST- astrócitos

BE- brometo de etídio

bFGF- fator básico de crescimento dos fibroblastos

CS- células de Schwann

CsA- ciclosporina

CY- ciclofosfamida

DNA- ácido desoxirribonucléico

EM- esclerose múltipla

GalC- galactocerebrosídio

GFAP- proteína glial fibrilar ácida

GGPFs-fatores promotores de crescimento glial

HLA- antígeno leucocitário humano

IF- imunofluorescência

IFN- interferon

IGF- fator de crescimento semelhante à insulina

IL- interleucina

LDP- linha densa principal

LIP- linha intraperiódica

MAG- glicoproteína associada à mielina

MBP- proteína básica da mielina

MDMs- membranas derivadas de mielina

MHC- complexo principal de histocompatibilidade

MOG- glicoproteína da mielina do oligodendrócito

NG2- sulfato de condroitina

O-2A- células progenitoras bipotenciais de oligodendrócito- astrócito tipo 2

OLG- oligodendrócito

OPCs- células progenitoras de oligodendrócitos

p.i.- pós injeção

PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas

PLP- proteína proteolipídica da mielina

SNC- sistema nervoso central

SNP- sistema nervoso periférico

TNF- fator de necrose tumoral

VIM- vimentina

ZSV- zona subventricular

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Matriz de dados de áreas marcadas por GFAP nos grupos: controle, brometo de etídio e brometo de etídio mais ciclofosfamida.....	70
ANEXO B – Certificados de submissão de artigos.....	71

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

RESPOSTA ASTROCITÁRIA E OLIGODENDROGLIAL NO TRONCO ENCEFÁLICO DE RATOS WISTAR IMUNOSSUPRIMIDOS E SUBMETIDOS AO MODELO DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO

AUTORA: ELIZA SIMONE VIÉGAS SALLIS

ORIENTADORA: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Data e local da defesa: Santa Maria, 31 de agosto de 2005.

Remielinização após desmielinização com brometo de etídio (BE) no tronco encefálico de ratos é realizada por oligodendrócitos e células de Schwann que invadem o tecido após a morte dos astrócitos. Embora a remielinização por oligodendrócitos seja detectada a partir dos 13 dias pós-intoxicação, a origem das células remielinizantes não é conhecida. Para esclarecer essa origem bem como o comportamento astrocitário em lesões induzidas pelo BE em ratos adultos normais (n=22) ou sob terapia

imunomoduladora (n=22), ratos Wistar adultos receberam uma injeção de 10 µl de BE na cisterna basal. Ratos Wistar receberam a injeção de BE enquanto sob terapia imunossupressora com ciclofosfamida (estudo astrocitário) (n=12) ou ciclosporina-A (n=10) (estudo da oligodendróglia). Os animais controle receberam uma injeção de 10 µl 0.9% de solução salina (n=16). Para o estudo astrocitário, os animais foram sacrificados aos 1, 2, 3, 7, 14 e 21 dias pós-injeção de BE. Astrócitos foram marcados com GFAP (proteína glial fibrilar ácida) e foi detectada gliose isomórfica nas lesões, mais marcada naqueles animais tratados com ciclofosfamida (CY). Embora existisse diferença entre a marcação por GFAP nos ratos que receberam somente BE e os que receberam BE e CY, os desvios das médias obtidas através da análise de imagem, não permitiram uma conclusão sobre a significância dessa diferença. Os ratos do experimento sobre a oligodendróglia foram sacrificados aos 15, 21 e 31 dias p.i. do BE. Tecidos de ratos normais injetados com BE e ratos injetados e tratados com ciclosporina foram marcados com imunofluorescência (IF) para OSP (proteína específica do oligodendrócito) que marca células maduras da linhagem oligodendrogliol. O resultado foi a marcação de células maduras que remielinizavam em áreas próximas ao tecido normal, mostrando oligodendrócitos maduros como fonte celular na reparação das bainhas perdidas. O modelo de desmielinização do BE permitiu estudar a atividade da neurógliia em lesões que foram remielinizadas por oligodendrócitos maduros e nas que os astrócitos responderam seletivamente a imunossupressores que interferem com a reação inflamatória dentro do tecido.

Palavras-chave: desmielinização, remielinização, neurógliia, brometo de etídio, GFAP, OSP, ciclosporina A, ciclofosfamida.

ABSTRACT

Doctoral Thesis

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ASTROCYTIC AND OLIGODENDROGLIAL RESPONSE OF THE BRAIN STEM
OF IMMUNOSUPPRESSED WISTAR RATS SUBMITTED TO THE ETHIDIUM
BROMIDE DEMYELINATING MODEL

AUTHOR: ELIZA SIMONE VIÉGAS SALLIS

ADVISER: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Santa Maria, August 31, 2005.

Brain stem remyelination following demyelination induced by ethidium bromide (EB) is carried out by oligodendrocytes and Schwann cells that invade the central nervous system when astrocytes are lost. Although oligodendrocyte remyelination is detected from 13 days onward within the lesions, the origin of the remyelinating cells is not known. To clarify oligodendrocyte origin as well as to observe astrocytic behaviour in normal (n=22) as well as immunosuppressed animals (n=22) adult Wistar rats were injected with EB in the basal cisterna. Wistar rats had an EB injection while treated with

cyclophosphamide (astrocyte investigation, n=12) or cyclosporine A (oligodendrocyte study, n=10). Control animals had a single injection of 10 µl of 0.9% saline (n=16). For the investigation on astrocytes, the rats were killed at 1, 2, 3, 7, 14 and 21 days a.i. GFAP labelled astrocytes were conspicuous within the lesions and isomorphic gliosis was detected, more marked in those rats immunosuppressed with CY. Nonetheless a significant difference among the groups could not be established because of the mean deviations detected by the image studies. For the oligodendrocyte investigation the rats were killed at 15, 21 and 31 days a.i. Lesions of EB injected in normal and cyclosporine A-treated Wistar rats labelled positive for OSP (oligodendrocytes specific protein). This result points to mature oligodendrocytes as a source of remyelinating cells to restore the lost myelin sheaths after EB injection. The EB model of demyelination allowed the observation of the neuroglia in lesions where remyelination is made up by mature cells of the oligodendroglial lineage and where astrocytes respond selectively to immunosuppressive drugs that modify the inflammatory reaction induced by EB.

Key words: Demyelination, remyelination, neuroglia, GFAP, OSP, ethidium bromide, cyclosporine A, cyclophosphamide.

1.INTRODUÇÃO

O sistema nervoso (SN) constitui o maior desafio morfológico e funcional de todos os tecidos do indivíduo. No sistema nervoso central (SNC) um emaranhado de processos celulares sustenta a rede neural que comanda o organismo. No sistema nervoso periférico (SNP) fibras organizadas em fascículos completam as conexões. Os estímulos são recebidos e enviados pela existência de uma malha de células que produz e sustenta as bainhas de mielina, estruturas lipoprotéicas que garantem a condução saltatória das fibras (Graça, 1988a).

Na desmielinização, as bainhas de mielina são perdidas e a habilidade de conduzir potenciais de ação das fibras é diminuída ou eliminada até que as bainhas sejam restauradas.

É conhecida a capacidade limitada do SNC em restaurar as bainhas perdidas (de origem oligodendroglial); o contrário ocorre no SNP onde a função de produzir e sustentar as bainhas cabe às células de Schwann (CS). Células diferentes em microambientes diferentes têm comportamento diferente: os oligodendrócitos (OLGs) são células pós-mitóticas e somente podem ser substituídas após destruição pela existência de precursores da linhagem mesmo em indivíduos adultos. Ainda, carregam consigo e na mielina moléculas inibidoras da regeneração neuronal. As CS, por outro lado, são células estáveis que respondem rapidamente a estímulos lesivos e que favorecem e estimulam a regeneração das fibras (Riet-Correa *et al.*, 2002).

Pelo exposto acima, os processos degenerativos de cada território do SN induzem respostas diferentes. Enquanto no SNC após desmielinização, a remielinização nem sempre é bem sucedida, no SNP ela pode ser completa. A chave da questão reside na célula mielinizante.

Nos modelos de desmielinização experimental, o processo degenerativo é usualmente seguido de remielinização, principalmente nos modelos que usam substâncias tóxicas indutoras. No modelo do brometo de etídio (BE), a remielinização é realizada por OLGs e por CS. Devido à capacidade de resposta das CS, uma vez que consigam eludir a membrana limitante glial, a invasão do SNC é seguida por rápida

reparação das bainhas perdidas. A remielinização é completa, principalmente na medula espinhal (Graça *et al.*, 2001).

Após várias modificações do modelo básico de desmielinização do BE, dúvidas pontuais em relação às células gliais e à remielinização foram esclarecidas. Em doenças desmielinizantes espontâneas como a esclerose múltipla (EM) e a cinomose a remielinização é geralmente falha devido às condições intrínsecas do SNC e à ocorrência concomitante de processos imuno-inflamatórios. No modelo do BE, na maioria das lesões a remielinização é completa ou bem avançada a partir dos 30 dias p.i.

Com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre a neuróglia no modelo do BE, dois estudos foram realizados, que constituem o objetivo desta tese:

a) Caracterizar a resposta astrocitária em ratos Wistar desmielinizados com brometo de etídio e imunossuprimidos com ciclofosfamida;

b) Detectar a participação de oligodendrócitos maduros no processo de remielinização de ratos Wistar desmielinizados com brometo de etídio e imunossuprimidos com ciclosporina A.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Células gliais

As células que dão suporte ao sistema nervoso central (SNC) são as células da neurógliia, denominadas de macróglia: os OLGs (interfasciculares e satélites perineuronais) e os astrócitos (ASTs) (fibrosos e protoplasmáticos), ambas com origem neuroectodérmica. As outras células da glia, denominadas de micróglia, são derivadas de células de linhagem hematogênica e originárias do mesoderma que invadem o tecido nervoso no período neonatal.

Os **astrócitos** (Figura 1A) constituem as maiores e mais numerosas células da neurógliia nos mamíferos, têm muitos prolongamentos e núcleo esférico central, excedendo o número de neurônios na proporção de 10:1. São divididos em protoplasmáticos (tipo I), encontrados principalmente na substância cinzenta, e fibrosos (tipo II), achados ao longo dos tratos mielinizados (Summers *et al.*, 1995; Junqueira & Carneiro, 1999). Essas células caracterizam-se pela presença de prolongamentos com filamentos intermediários (fibrilas gliais), cujo componente principal é a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a vimentina (VIM), que servem como meio de identificação desse tipo celular em estudos *in situ* e em cultivo (Montgomery, 1994). O estudo da expressão desses marcadores na linhagem astrogliial demonstra que logo após o nascimento, há progressivo desaparecimento de VIM e substituição por GFAP. Porém, após uma agressão no SNC, além de ocorrer astrocitose, astrogliose e um aumento na marcação de GFAP nos prolongamentos espessados, há recuperação da capacidade astrocitária em expressar VIM, desaparecida durante o desenvolvimento normal do tecido nervoso (Bondan *et al.*, 2003).

Através de métodos imunoistoquímicos, foram marcados em culturas de nervo ótico perinatal de ratos, dois tipos de astrócitos, originários de linhagens celulares distintas. Os ASTs tipo 2, identificados morfológicamente como fibrosos, à semelhança dos OLGs, mostraram-se originários de células positivas para o anticorpo monoclonal A2B5, marcador de células conhecidas como progenitoras bipotenciais O-2A.

Dependendo da influência microambiental, essas células O-2A são capazes de originar tanto células negativas a A2B5 e positivas a galactocerebrosídeo (GalC+) e proteína básica da mielina (MBP+) caracterizando os OLGs, quando positivas a A2B5 e GFAP geraram os astrócitos tipo 2. Devido à dificuldade de diferenciação das células A2B5 em AST *in vivo*, essas células são atualmente denominadas de OPCs (células precursoras de OLGs), originam somente oligodendrócitos, portanto A2B5 serve como marcador de células jovens desta linhagem (Stangel & Hartung, 2002). Os ASTs tipo 1, correspondentes aos protoplasmáticos, representam o estágio diferenciado de outra linhagem celular, a qual envolve células-tronco multipotenciais, com funções que incluem a indução de proliferação e diferenciação da linhagem O-2A (Rench-Constant & Raff 1986; Raff *et al.*, 1983; Raff, 1989; Summers *et al.*, 1995).

Dentre as funções dos AST destacam-se: a manutenção da homeostase no microambiente neural, através da detoxificação de substâncias tóxicas criadas no SNC, captação de neurotransmissores, regulação do pH, osmolaridade e concentração iônica do tecido nervoso (Bignami & Dahl, 1994). Devido à presença de junções de comunicação, os AST formam um sincício funcional no qual mudanças na concentração de íons e moléculas solúveis são rapidamente equilibradas. Essas exigências são muito maiores na substância cinzenta do que na branca, sendo os AST diferentes em sua habilidade para regular o microambiente. A detoxificação de amônia e de radicais livres encefálicos é também realizadas por eles (Ransom *et al.*, 2003). Os AST participam, também, da formação e manutenção da glia limitans e prolongamentos perivasculares dando suporte estrutural, imunomodulação, indução e manutenção da barreira hematoencefálica, produção e secreção de proteínas da matriz extracelular, síntese de moléculas de adesão, fagocitose e funções como expressão de moléculas codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I e II, reparação após agressões ao SNC, orientação da migração neuronal durante o desenvolvimento do SNC; isolamento das superfícies neuronais, modulando a transmissão de impulsos nervosos, regulação da sinaptogênese, modulação de sinapses excitatórias e inibitórias, e processamento de informação (Ransom *et al.*, 2003), suporte mecânico para os oligodendrócitos durante a mielinização e degradação da mielina

extracelular (Raff, 1989; Peters *et al.*, 1991; Michael & Norenberg, 1994; Montgomery, 1994; Summers *et al.*, 1995).

Os AST participam da reparação do tecido nervoso, aumentando em número e em dimensões. Essas mudanças incluem espessamento dos feixes de filamentos gliais com conseqüente aumento na marcação de GFAP (Bondan *et al.*, 2003; Montgomery, 1994). Estas alterações são denominadas de gliose astrocitária, astrocitose e astrogliose reativa, cicatriz glial, podendo ser isomórfica, quando os processos astrocitários estão orientados pelos elementos teciduais preservados e o arranjo dos feixes de filamentos gliais é uniforme e paralelo e, anisomórfica, na qual sua disposição é irregular ao redor da lesão, geralmente acentuada, com ruptura da barreira hemato-encefálica (Bignami Dahl, 1994).

Os **oligodendrócitos** (Figura 1B) são as células produtoras de mielina no SNC. Produzem e mantêm os internodos das bainhas de mielina durante toda a sua vida, permitindo a condução saltatória, portanto a comunicação rápida entre o SNC e os tecidos. Essas células ocorrem alinhadas entre os feixes de fibras nervosas (OLGs interfasciculares) ou em íntima associação com os corpos celulares neuronais (OLGs satélites). Os interfasciculares são os responsáveis pela formação das bainhas de mielina internodais dos axônios no SNC, enquanto os satélites desempenham a função de suporte neuronal e possuem potencialidade para formar mielina (Ludwin, 1979). À microscopia eletrônica de transmissão, foram classificados de acordo com sua eletrodensidade e tamanho em claros, médios e escuros, o que pode refletir diferentes estágios de maturação ou atividade metabólica (Peters *et al.*, 1991). OLGs claros constituem os de maior tamanho e os que mais rapidamente se dividem, tornando-se mais escuros e pequenos à medida que amadurecem. O núcleo é arredondado, oval ou irregular. A cromatina ocorre em grumos homogêneos e o nucléolo é proeminente e claramente identificável somente nas células mais pálidas. O citoplasma do OLG interfascicular é usualmente de alta densidade devido à presença de grande número de pequenos grânulos entre as organelas (Peters *et al.*, 1991).

Os OLGs diferenciam-se de precursores altamente proliferativos e móveis que, nos roedores originam-se na zona subventricular (ZSV) do encéfalo e da medula espinhal e camada ventricular do tubo neural antes do estágio progenitor.

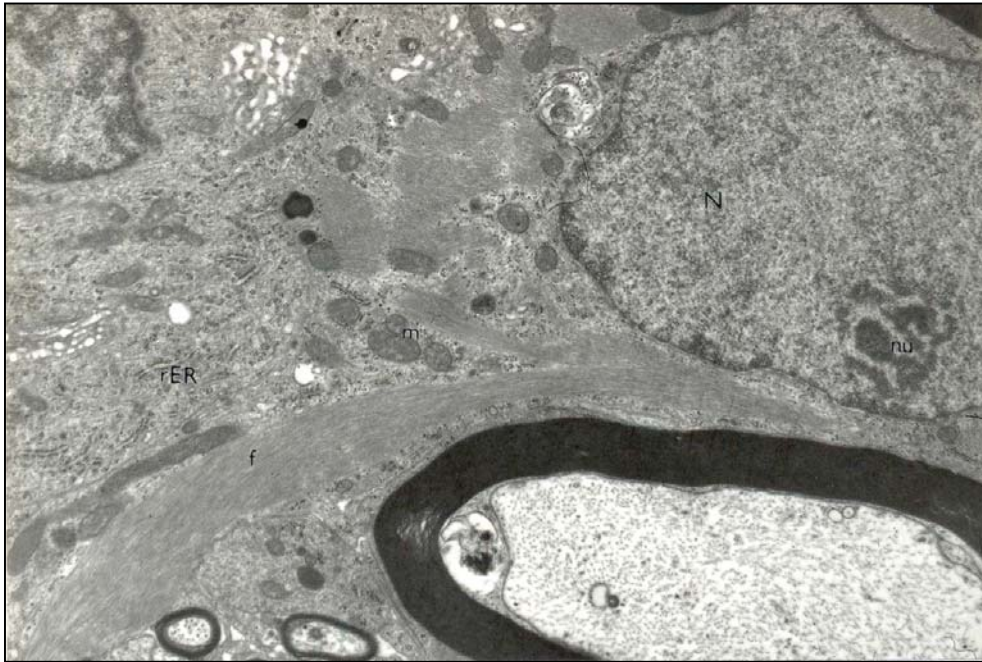


Figura 1A. Astrócito na substância branca da medula espinhal: (N) núcleo; (nu) nucléolo; (f) filamento glial; (m) mitocôndria; (rER) retículo endoplasmático rugoso. 10750x (De: Graça, 1986).

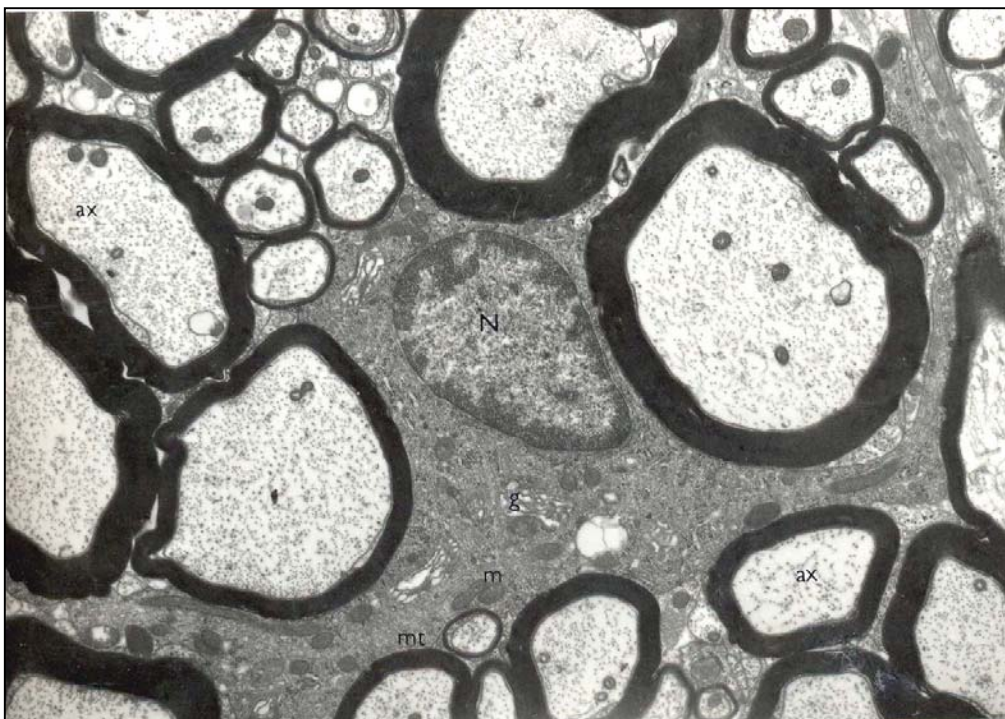


Figura 1B. Oligodendrócito interfascicular na substância branca da medula espinhal: (N) núcleo; (g) complexo de Golgi; (m) mitocôndria; (mt) microtúbulos; (ax) axônio mielinizado. 10750x (De Graça, 1986).

A oligodendrogênese pós-natal continua na ZSV, mesmo após os focos primários de precursores terem desaparecido (Nait-Oumesmar *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000). A progênie dessas células precursoras coloniza as substâncias branca e cinzenta, e diferencia-se em OLGs maduros, iniciando a síntese de mielina. No SNC em desenvolvimento, precursores de OLGs originam-se em locais restritos, muitas vezes migrando a longas distâncias antes de atingir seu destino. Essa migração é regulada por proteínas da matriz extracelular, fatores de crescimento e interações célula-célula com outras células neurais (Frost *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000).

A proliferação celular de OLGs diminui após as duas primeiras semanas do nascimento, porém células em divisão persistem no SNC em animais adultos (Alonso 2000; ffRench-Constant & Raff, 1986; Levine *et al.*, 2001). Essas células progenitoras de oligodendrócitos (OPCs) persistem num número substancial em quiescência, dando origem a novos OLGs após uma lesão (Shi *et al.*, 1998). Kondo & Raff (2000) observaram, em cultivo celular, que OPCs sob certas circunstâncias podem reverter a células tronco neurais multipotenciais, se diferenciando em neurônios e células gliais. A sobrevivência de OLGs que sintetizam mielina, corresponde aos axônios disponíveis, os que falham em contactar axônios sofrem apoptose (Frost *et al.*, 1999; Casaccia-Bonnel, 2000; Levine *et al.*, 2001).

No nervo óptico, a atividade elétrica axonal normalmente controla a produção e liberação de fatores de crescimento responsáveis pela proliferação de precursores de OLGs, controlando o número de OLGs em desenvolvimento (Barres & Raff, 1993). Barres & Raff (1999) investigaram o controle axonal sobre o desenvolvimento da oligodendróglia, verificando que os axônios interferem na proliferação dos OLGs, mas não na sua diferenciação e, à diferença dos progenitores de AST, os progenitores de OLGs mudam o fenótipo antigênico após sua divisão.

Vários fatores de crescimento podem ser importantes na modulação da proliferação rápida e diferenciação das células progenitoras de OLGs, após lesão. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator básico de crescimento dos fibroblastos (bFGF), as integrinas e neuregulinas, são mitogênicos *in vitro* para as células e previnem, quando juntos, sua diferenciação prematura em oligodendrócitos maduros (Noble *et al.*, 1988; Raff, 1989; Shi *et al.*, 1998; Frost *et al.*, 1999; Casaccia

Bonnefil, 2000). Em particular, o fator de crescimento sintetizado pelas células de Schwann-neurotrofina-3, aumenta o tempo de sobrevivência de OLGs maduros, estimula a proliferação de progenitores de OLGs e remielinização. Por sua vez, os fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF-I e II) e o proteoglicano NG2 estimulam a diferenciação das células O-2A em oligodendrócitos (Trapp *et al.*, 1997; Nishiyama *et al.*, 1999; Mason *et al.*, 2000; Fushimi & Shirabe 2004). Fatores promotores de crescimento glial (GGPFs) são capazes de estimular a proliferação de oligodendrócitos e de astrócitos *in vitro*. Além disso, a interleucina-2 (IL-2), produto de células T, inibe a proliferação das células progenitoras de oligodendrócitos e aumenta a diferenciação oligodendroglial e a sua maturação, demonstrado pela maior expressão de proteína básica da mielina (MBP). De maneira semelhante, os corticosteróides inibem a proliferação de OLGs em todas as regiões do encéfalo, enquanto estimulam a diferenciação e mielinização *in vitro* e *in vivo* (Benveniste & Merrill, 1986; Alonso, 2000; Cheng & Vellis, 2000).

Os marcadores da linhagem oligodendroglial são abundantes e mudam de acordo com a maturação das células (Quadro 1).

A **micróglia** (Figura 1C) é considerada a população histiocítica residente do SNC, pertencente ao sistema fagocitário mononuclear, e representa aproximadamente 10% das células gliais (Benveniste, 1992; Gartner & Hiatt, 1997). Ela apresenta várias denominações devido à sua variedade morfológica. As principais são: micróglia amebóide, ramificada e a reativa, que são formas diferentes de um único tipo celular, refletindo estágios funcionais diferentes (Thomas, 1992).

A micróglia amebóide está presente no SNC em desenvolvimento, fagocitando restos celulares eliminados nos estágios iniciais de formação do tecido nervoso. Com o desenvolvimento neural, a micróglia amebóide vai sendo substituída pela ramificada, que possui numerosos processos em estado inativo, razão pela qual é denominada de micróglia quiescente.

A população de células microgliais residentes no SNC pode transformar-se na forma reativa após lesões ao SNC e, acompanhando o reparo, retornar ao estágio de micróglia ramificada. Essas transformações ocorrem em qualquer momento do período pós-natal e em qualquer área do tecido nervoso próximo ao local da lesão, iniciando

logo após o evento e persistindo por várias semanas dependendo da extensão do dano causado (Thomas, 1992). Toda a superfície de acesso ao SNC apresenta-se resguardada por uma população de macrófagos – os meningeanos, que guardam a superfície pial; as

Precusores/progenitores durante desenvolvimento	Progenitores do adulto
PSA-NCAM PDGF α -R A2B5 O4	NG2 O4 PDGF α -R
OLGs pré-mielinização	OLGs pós-mitóticos
DM-20/PLP NG2 PDGF α -R Connexina 32	GalC MBP OSP MOG CNP

Quadro 1. Marcadores da linhagem de oligodendrócitos

PSA-NCAM: integrina (Grinspan et al., 2000); PDGF α -R: receptor de PDGF (Casaccia-Bonnet, 2000); A2B5: polisialogangliosídeo de superfície (Raff et al., 1983); O4, anticorpo monoclonal da superfície celular (Levine & Reynolds, 2001); DM-20, produto da proteína proteolípica (Levine & Reynolds, 2001); NG2, proteoglicano sulfato de condroitina (Nishiyama et al., 1999); Conn 32 (Rogister et al., 1999) MOG, glicoproteína da mielina de OLG (Levine & Reynolds, 2001); OSP, proteína específica do OLG (Tiwari-Woodruff et al., 2001). CNP: 23-nucleotídeo cíclico 3 – fosfohidrolase (Levine & Reynolds, 2001); GalC, galactocerebrosídeo (Levine & Reynolds, 2001); MBP, proteína básica da mielina (Levine & Reynolds, 2001).

células supraependimárias e epíplexus que protegem a superfície ventricular e, o acesso a partir dos vasos sanguíneos é potencialmente defendido pelos pericitos (Thomas, 1992).

A micróglia quando ativada, secreta produtos biologicamente ativos, que participam da resposta inflamatória e influenciam a formação da cicatriz glial, a neovascularização e a regeneração neural, além de expressar moléculas do MHC atuando na apresentação de antígenos e na ativação linfocitária durante respostas imunes no SNC (Benveniste, 1992; Thomas, 1992).

2.2. Mielinização

A **mielina** é uma estrutura membranosa característica do tecido nervoso, depositada em segmentos ao longo de fibras nervosas selecionadas e que funciona como isolante a fim de aumentar a velocidade de transmissão do estímulo entre o corpo celular neuronal e seu alvo. Esses segmentos providos de bainhas de mielina são denominados internodos e são interrompidos, em intervalos regulares, pelos nodos de Ranvier (Graça, 1988a).

Os dois principais constituintes químicos da mielina são os lipídios e as proteínas; os lipídios perfazem 70 a 80% da mielina tanto no SNC como no SNP e incluem colesterol, galactolipídios e fosfolipídios. As proteínas perfazem 30% da mielina (van der Goes & Dijkstra, 2001), sendo a mielina central constituída de proteolipídios (PLP), proteínas básicas da mielina (MBP) e proteínas ácidas. Já as principais proteínas da mielina periférica são as glicoproteínas, principalmente as de alto peso molecular.

O processo de **mielinização** envolve a aposição espiral de membranas celulares derivadas das células mielinogênicas ao redor de axônios selecionados. No SNC, estima-se que cada oligodendrócito pode mielinizar através de seus prolongamentos citoplasmáticos de 30 a 50 internodos, podendo chegar a 200, o que facilita a condução rápida de potenciais de ação (Dyer *et al.*, 2000); enquanto no SNP cada célula de Schwann forma apenas um internodo de mielina (Graça, 1988b), excepcionalmente dois ou mais (Bondan *et al.*, 1999).

A mielinização compreende duas etapas – na primeira, a célula formadora de mielina relaciona-se com o axônio em resposta a sinais axonais, e a segunda, de deposição de um volume de mielina complementar à área do axônio com o qual tornou-se associada (Blakemore, 1982b).

No SNC, cada processo citoplasmático emitido pelo oligodendrócito gira e alonga-se em torno do axônio, formando uma espiral frouxa, com subsequente extrusão do citoplasma e compactação das camadas membranosas, criando uma estrutura lamelar. No SNP, o mesmo processo é feito pela rotação da célula de Schwann. A aposição das faces citoplasmáticas da membrana celular forma uma linha eletrodensa

espessa, denominada linha densa principal (LDP), enquanto a aposição de suas faces externas origina uma banda menos eletrodensa, a linha intraperiódica (LIP) (Graça, 1988a; Peters *et al.*, 1991) (Figura 2).

Nos nodos de Ranvier do SNP, o axolema contacta um conjunto de projeções das células de Schwann de internodos vizinhos, bem como se relaciona com a lâmina basal contínua. Já no SNC, os nodos de Ranvier apresentam-se recobertos com processos citoplasmáticos astrocitários e ocasionalmente de oligodendrócitos (Butt *et al.*, 1999). A célula de Schwann necessita de uma matriz extracelular estável para interagir com o axônio e realizar a mielinização. Já no SNC, em função da escassez de componentes do tecido conjuntivo no parênquima, observações sugerem que astrócitos tipo 2 poderiam ser os responsáveis pela estabilização da relação axônio-oligodendrócito, considerando-se necessária sua presença como elemento adicional no processo de formação das bainhas de mielina (Bunge *et al.*, 1978).

2.3. Desmielinização

O termo **desmielinização** refere-se ao processo de remoção de bainhas de mielina previamente formadas. Quando a perda se dá por instabilidade ou dano na célula mielinogênica ou na bainha de mielina, com preservação dos axônios, a desmielinização é dita primária, devendo ser diferenciada da que ocorre por degeneração axonal (degeneração Walleriana) denominada de secundária (Blakemore, 1982b; Graça, 1988a; Peireira *et al.*, 1996). O termo **dismielinização** refere-se à produção de bainhas de mielina instáveis e anormais, causada por alterações metabólicas e cursa com **hipomielinogênese** (Hauw *et al.*, 1992; Bondan *et al.*, 1998a).

A alteração estrutural das bainhas de mielina é uma seqüela comum após uma grande variedade de eventos patológicos, incluindo intoxicações, desordens metabólicas e nutricionais, infecções virais, trauma mecânico e inflamação (Hauw *et al.*, 1992).

Dentre as várias doenças que cursam com desmielinização primária no SNC, destacam-se a visna dos ovinos, a cinomose dos cães e a esclerose múltipla dos humanos. As duas últimas são os paradigmas dos processos desmielinizantes. A lesão pode ocorrer como principal componente da doença ou devido a alterações secundárias

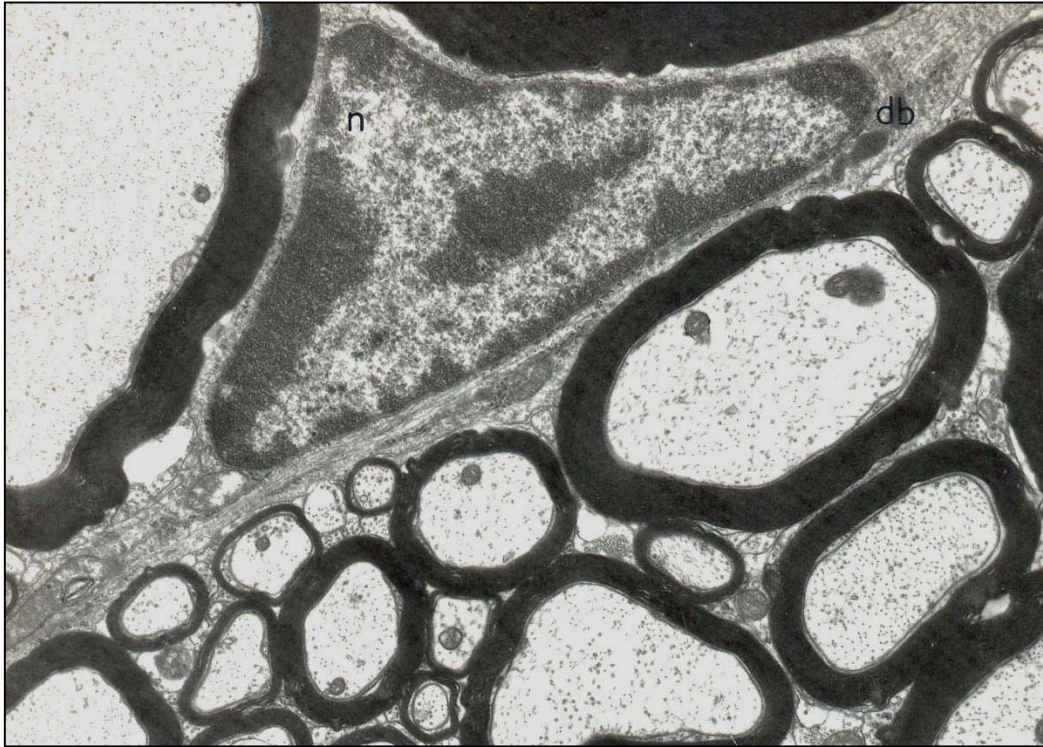


Figura 1C. Microglia na substância branca da medula espinhal: (n) núcleo grande e alongado; (db) citoplasma eletrolucente com corpo denso. 10750x (De Graça, 1986).

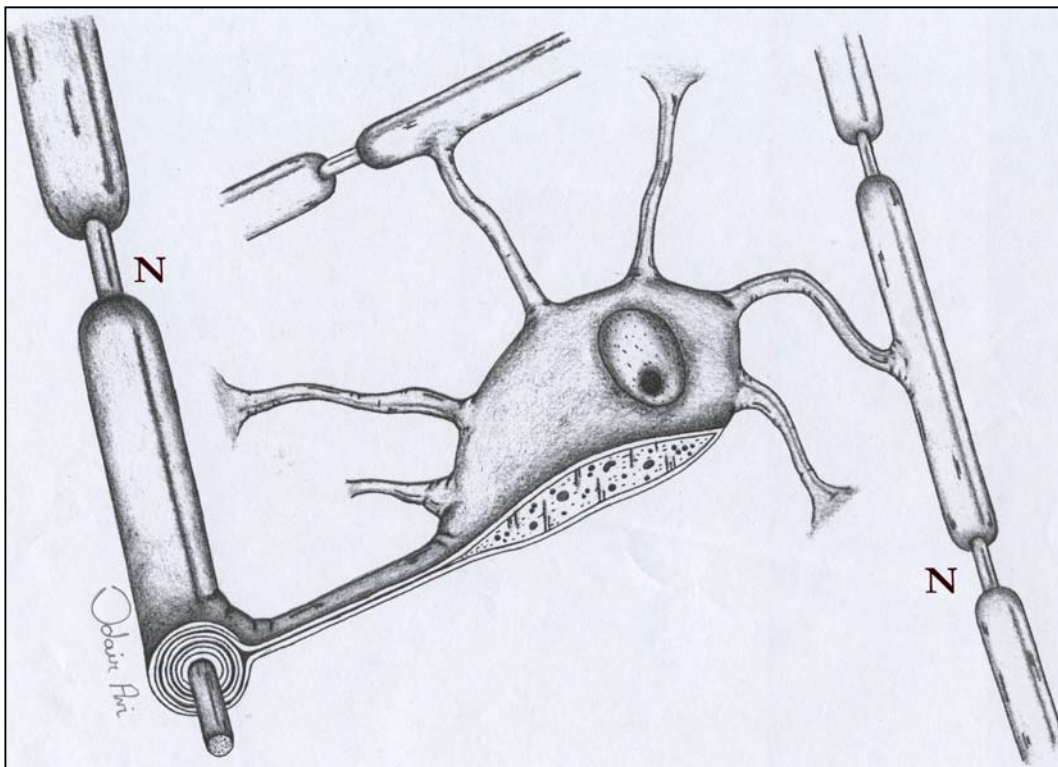


Figura 2. Oligodendrócito estende seus processos para formar os internodos de mielina de vários axônios (N: nodo de Ranvier).

a reações inflamatórias ou imunomediadas (Raine, 1984; Rezende & Arruda, 1998; Bronstein *et al.*, 1999; Bronstein *et al.*, 2000; Nait-Oumesmar *et al.*, 2000; Headley *et al.*, 2001; Hemmer *et al.*, 2002; Owens, 2003).

A **cinomose** é causada por um morbilivírus que induz encefalite aguda a crônica com desmielinização multifocal. Este agente infecta principalmente astrócitos, mas a ação do vírus também é descrita em oligodendrócitos (Headley *et al.*, 2001). Não se conhece exatamente a patogenia da desmielinização observada na doença: se ocorre devido a uma sensibilização ativa a componentes mielínicos ou se o processo desmielinizante resulta de um efeito citolítico viral direto sobre os oligodendrócitos. Poderia ainda ser explicado em função de uma possível reação cruzada entre proteínas virais e mielínicas ou dano mielínico acidental (desmielinização *bystander*), resultante da resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, que cursaria com a liberação de fatores citotóxicos, como citocinas, óxido nítrico e proteases neutras (Botteron *et al.*, 1992; Vandeveldel & Zurbriggen, 2005). É descrito que a desmielinização inicial pode ser em decorrência de distúrbios metabólicos de oligodendrócitos ocasionados pelo vírus. Em estágios mais avançados da doença, complicações imunológicas levam à progressão da desmielinização podendo ocorrer morte de oligodendrócitos por apoptose, necrose ou outros mecanismos (Schobesberger *et al.*, 1999). É interessante apontar que comprovadamente, a desmielinização precede a perda oligodendroglial (Schobesberger *et al.*, 2002)

A **esclerose múltipla** (EM) é uma doença inflamatória desmielinizante do SNC, na qual há destruição da bainha de mielina, oligodendrócitos, axônios e reação inflamatória local (Chang *et al.*, 2000). A patologia indica a participação de resposta imune mediada por linfócitos T na indução das lesões desmielinizantes e de anticorpos direcionados contra componentes mielínicos de superfície, sugerindo uma doença auto-imune, desencadeada por fatores ambientais em indivíduos geneticamente susceptíveis. Há indução de superexpressão de citocinas como, IL-1, IL-2, IL-3, IFN-gama, TNF-alfa e beta, e a expressão de moléculas específicas na membrana das células do SNC, como o antígeno leucocitário humano (HLA), moléculas de adesão celular e MHC de classe II nas células endoteliais que ativam a função fagocítica de macrófagos e células da

micróglia (Raine, 1990; Rezende & Arruda, 1998; Hemmer *et al.*, 2002). A natureza do antígeno da reação e o mecanismo pelo qual o sistema imune exerce seus efeitos sobre o sistema nervoso são ainda desconhecidos (Bondan *et al.*, 1998a, Hemmer *et al.*, 2002). Na EM, várias proteínas são auto-antígenos, como MBP (proteína básica da mielina), PLP (proteína proteolípídica da mielina), MAG (glicoproteína associada à mielina) e MOG (glicoproteína da mielina do oligodendrócito). Uma das principais é a MBP, que predomina no SNC de adultos e sua função é estabilizar a bainha de mielina, perfazendo um total de 60% das proteínas da mielina. Sua expressão não é restrita ao SNC, sendo encontrada também, no SNP.

Na EM, verificam-se padrões variados de inflamação e desmielinização recorrentes com destruição de OLGs ou não, e perda axonal, sugerindo que a patogênese das lesões é diferente nos pacientes e resulta de interações de fatores imunes, genéticos e ambientais (Bondan *et al.*, 1998a; Hemmer *et al.*, 2002). Estudos indicam (OPCs) estão presentes no SNC de adultos saudáveis e são observados, também, nas lesões de EM. Fatores ambientais, como a ausência de síntese de fatores gliotróficos, de sinais promotores e a falta de um estímulo de crescimento ou a ação de moléculas inibitórias como tenascina pelos astrócitos, podem ser obstáculos para o recrutamento de progenitores de oligodendrócitos na lesão, não ocorrendo remielinização completa (Nait-Oumesmar *et al.*, 2000; Owens, 2003).

Com a finalidade de esclarecer a fisiopatologia celular do processo de desmielinização primária-remielinização, observado nas doenças espontâneas do homem e dos animais, vários modelos experimentais têm sido desenvolvidos para estudar os eventos celulares envolvidos, que ainda são pouco conhecidos, a fim de se adotarem as medidas terapêuticas para minimizar a limitada remielinização que ocorre nessas doenças desmielinizantes do SNC. Esses modelos experimentais de desmielinização têm sido desenvolvidos *in vivo*, pelo uso de técnicas como:

- Indução de reações imunológicas contra componentes mielínicos, como pela injeção subcutânea ou intracutânea de emulsão encefalitogênica contendo substância branca de encéfalo ou medula espinhal ou mielina purificada, para induzir uma resposta auto-imune (Raine *et al.*, 1969).

- Inoculação viral, tanto de vírus que possuem efeito lítico direto sobre os oligodendrócitos, tais como o vírus da hepatite murina variedade JHM, quanto daqueles capazes de indução de reações imunológicas contra células que expressam antígenos virais; como por exemplo, a desmielinização decorrente da infecção pelo vírus Semliki Forest (Dal Canto & Lipton, 1980; Kelly *et al.*, 1982).
- Pelo uso de pressão mecânica sobre a mielina, de maneira focal e leve ou por aumento crônico da compressão (Fish & Blakemore, 1983).
- Administração sistêmica de substâncias tóxicas tais como cianeto (Hirano *et al.*, 1967) e cuprizone (Blakemore *et al.*, 1983).
- Através da injeção local de agentes mielinolíticos ou gliotóxicos, tais como, a toxina diftérica, 6-aminonicotinamida (6-AN), lisolecitina (lisofosfatidilcolina-LPC) e brometo de etídio (BE) (Harrison *et al.*, 1972; Blakemore *et al.*, 1983; Shields *et al.*, 1999; Bondan *et al.*, 2000; Windrem *et al.*, 2002; Fushimi & Shirabe, 2004).
- Em ensaios *in vitro*, com diferentes concentrações da proteína básica da mielina (MBP) em cultivo celular de OLGs maduros e AST de encéfalo de suínos, com destruição de oligodendrócitos e mielina, observando-se áreas focais de desmielinização, com preservação de axônios e astrócitos e, experimentos *in vivo*, com indução de áreas focais de desmielinização (Althaus *et al.*, 2000).

A degradação das bainhas de mielina é feita por células fagocitárias derivadas da micróglia, com leves variações morfológicas, devido ao modo de ação dos agentes desmielinizantes (Blakemore, 1982b). Essas bainhas mostram alterações ultra-estruturais antes da fagocitose caracterizadas por vesiculação e formação de estruturas reticulares semelhantes a favos de mel (*honeycomb*), (Ludwin, 1979; Graça & Blakemore, 1986; Bondan *et al.*, 1998a). Podem ser observados, também, fragmentos de mielina em vesículas no interior de macrófagos, sendo transformadas rapidamente em gordura neutra, padrão de endocitose denominado de micropinocitose vermiforme, encontradas em doenças desmielinizantes rápidas, de origem imunomediada. (Bondan *et al.*, 1998a). Em algumas situações, a bainha de mielina pode ser liberada intacta do axônio e permanecer no espaço extracelular sendo, posteriormente, fagocitada ou

encontrando-se emaranhados de membranas derivadas de mielina, em locais com resposta macrofágica pouco intensa (Graça & Blakemore, 1986). Verifica-se, também, intenso infiltrado de macrófagos com desnudamento rápido das lamelas de axônios (Blakemore, 1982b; Fernandes *et al.*, 1997). Linfócitos são observados em lesões com desmielinização ativa, principalmente se a perda de mielina é de origem imunomediada como na EM (Raine, 1990), embora eles sejam detectados como parte da resposta inflamatória em lesões de origem tóxica (Graça, 1988b; Bondan *et al.*, 1998a).

2.4. Remielinização

O termo remielinização significa reconstrução das bainhas de mielina perdidas. Na EM, a doença desmielinizante mais importante no homem, há falha na remielinização e, por muito tempo, foi pensado que esse processo não ocorresse no SNC.

A remielinização no SNC foi descrita pela primeira vez por Bunge *et al.* (1961), após induzir desmielinização em gato por barbotagem do líquido. Embora o processo de remielinização ocorra, como demonstrado em vários modelos de desmielinização experimental induzidos quimicamente, ele depende de fatores como a intensidade e o tempo de exposição ao agente desmielinizante (Graça, 1988a).

A remielinização do SNC após exposição a agentes gliotóxicos como o BE ou mielinotóxicos como a lisolecitina, pode ser efetuada pelos OLGs ou pelas CS que invadem a área desmielinizada desde que os ASTs e, conseqüentemente, a membrana limitante glial tenham desaparecido da área e, após a remoção microglial de OLGs mortos e suas bainhas de mielina (Franklin & Blakemore, 1993; Graça *et al.*, 2001; Li *et al.*, 1999) (Figura 3). Em doenças espontâneas do tecido nervoso, como na EM, foram descritas, também, lesões remielinizadas por OLGs (Ghatak *et al.*, 1989) ou por CS (Itoyama *et al.*, 1983).

As condições básicas para o estabelecimento da remielinização permanecem em estudo. É condição para tal que o fator desmielinizante não persista no local, que os restos celulares sejam removidos e que os OLGs remanescentes regenerem seus processos ou que novos OLGs repovoem a lesão (Peireira *et al.*, 1996).

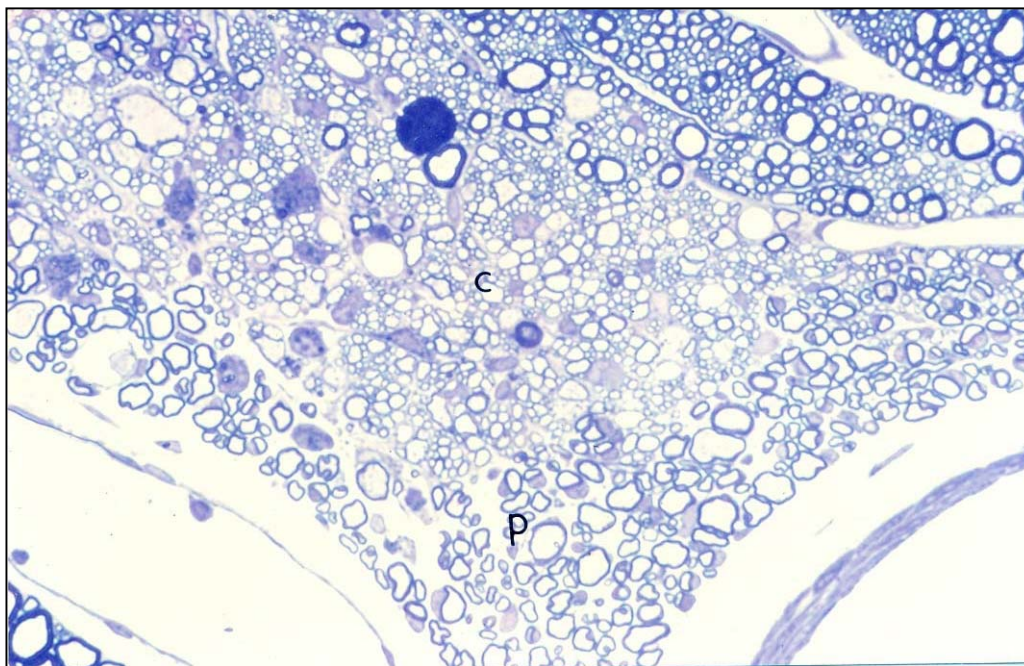


Figura 3. Lesão de 120 dias na coluna ventral. A área de remielinização central (c) é extensa e a área de remielinização periférica (p) é limitada a poucas fileiras sob a superfície pial. X250 (De Graça, 1986).

Apesar da remielinização ser evidente em alguns processos, a origem dos OLGs permanece controversa. A ausência de demonstração morfológica de mitoses nessas células gliais em indivíduos adultos levou à crença por muito tempo de que OLGs maduros após a mielinização fossem incapazes de divisão. Existem relatos da ocorrência em camundongos recém-nascidos, de divisão mitótica em OLGs relacionados com axônios mielinizados. Em experimentos radioautográficos com OLGs, demonstrou-se proliferação dessas células associadas a bainhas de mielina em camundongos jovens normais, bem como após indução de trauma cortical em camundongos adultos (Ludwin & Bakker, 1988). Nesse estudo, porém, a falta de marcação das células não permite saber se são células jovens ou maduras da linhagem. Esta capacidade de proliferação de OLGs foi observada, também, em lesões desmielinizantes induzidas experimentalmente por gliotóxicos como lisolecitina e BE

em ratos (Levine & Reynolds, 1999; Windrem *et al.*, 2002). A fonte de reposição de oligodendrócitos danificados em animais adultos seria a linhagem de células progenitoras bipotenciais O-2A adultas, existentes em estado quiescente na substância branca do SNC adulto e na placa subependimária, e que mediante estímulos apropriados, apresentam divisão e diferenciação, originando ASTs tipo 2 e OLGs maduros encarregados de remielinizar os axônios desmielinizados (Peireira *et al.*, 1996). Essas células são referidas no momento como células progenitoras adultas de OLGs (OPCs), permanecendo no encéfalo adulto em estado quiescente, proliferando e diferenciando-se em OLGs após lesões, mediante fatores de crescimento apropriados e mecanismos intrínsecos. Estudos demonstram que essas células se dividem e diferenciam mais lentamente em adultos do que no período perinatal (Shi *et al.*, 1998; Levine *et al.*, 2001). Segundo Noble *et al.* (1991), os OLGs têm uma fonte de reposição, desde que a gliose astrocitária, presente na maioria das lesões no SNC, não seja suficientemente grande para impedir a remielinização por esses OLGs de reposição.

Os OLGs são células pós-mitóticas, de modo que a existência de células precursoras é fundamental para a reparação das bainhas de mielina após desmielinização. Em condições experimentais é constatada a reparação através de OLGs e de CS, principalmente quando os ASTs são destruídos no processo (Pereira *et al.*, 1998; Bondan *et al.*, 2000). Em condições espontâneas (EM, cinomose, desmielinização *bystander*), a remielinização é defeituosa ou inexistente (Graça *et al.*, 2001; Headley *et al.*, 2001; Franklin, 2002), principalmente em processos recorrentes (Cenci *et al.*, 1999; Levine *et al.*, 2001). A remielinização pode falhar devido a um número insuficiente de mitógenos endógenos de OPCs direcionados para proliferação, ou porque há um número insuficiente de OPCs adultos disponíveis, em função da depleção causada pela lesão no sistema nervoso, ou por mecanismos intrínsecos do tecido ou falha na migração dessas células para a lesão (Shi *et al.*, 1998).

2.5. Brometo de etídio

O BE (brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenil-fenantridina) é um composto púrpura fluorescente, cuja molécula possui um cromóforo aromático plano de dimensões semelhantes àsquelas dos pares de bases do modelo de DNA descrito por Watson-Crick, o que permite sua intercalação entre os pares de bases de dupla hélice, causando alteração conformacional da cadeia e assim, impedindo a replicação e transcrição do DNA (Bondan *et al.*, 1998a,b). Estudos in vivo e in vitro demonstram sua permanência por até 72 horas em cultivos de células nervosas (Graça & Pereira, 1990).

O brometo de etídio (BE) tem sido utilizado como agente tripanocida em bovinos de corte. Também tem sido usado em estudos envolvendo sistemas de ácidos nucléicos isolados, em estudos dos efeitos dos agentes intercalantes em cultivos celulares e como droga indutora de desmielinização primária no SNC, por destruir seletivamente as células da glia na substância branca (Graça *et al.*, 2001) e intoxicar CS no SNP (Riet-Correa *et al.*, 2002).

2.6. Evolução do modelo experimental do BE no sistema nervoso

O BE é uma droga intercalante gliotóxica que é utilizada para induzir desmielinização focal no SNC, estudando-se com isso, os eventos de desmielinização e remielinização (Yajima & Suzuki, 1979; Blakemore, 1982a; Graça & Blakemore, 1986; Graça 1989 a, b; Fernandes *et al.*, 1997; Bondan *et al.*, 1998b; Pereira *et al.*, 1998; Wooddruff & Franklin 1999; Fushimi & Shirabe, 2004).

A droga quando injetada na cisterna basal de ratos *Sprague-Dawley* por Yajima & Suzuki (1979), induziu o aparecimento de espongiose nas regiões subpiaais da ponte e bulbo. Foram verificadas alterações degenerativas das bainhas de mielina devido à morte dos OLGs. No 6º dia pós-injeção, o centro da lesão apresentava a maioria de seus axônios desmielinizados, com desaparecimento dos OLGs e abundante infiltrado de macrófagos com restos de mielina em seu citoplasma. Cerca de 12 dias após a injeção, ocorreu remielinização por OLGs e eventuais CS.

Injeções intramedulares de BE nas colunas dorsais da medula lombar de gatos adultos (Blakemore 1982a) e ratos (Graça & Blakemore, 1986) determinaram áreas de

desmielinização. Em gatos, no 2º dia p.i., OLGs e ASTs já mostravam alterações morfológicas, porém, lesões desmielinizantes foram verificadas entre 8 e 14 dias p.i. do BE. A remielinização foi constatada a partir do 16º dia, com as CS como tipo celular predominante. Nos ratos Wistar, as lesões variaram quanto à extensão e aspecto histológico de acordo com a dose de BE empregada e a velocidade com a qual as CS remielinizaram os axônios desmielinizados. Três tipos de lesões foram descritas, sendo classificadas de acordo com a rapidez do reparo miélinico em tipo I (desenvolvimento rápido), II (lento) e III (intermediário) (Graça & Blakemore 1986; Graça 1989b). A evolução das lesões variou de acordo com a dose aplicada. As lesões do tipo II, caracterizaram-se por atraso na atividade fagocitária de retirada dos restos gliais, persistência de membranas derivadas de mielina (MDM) em torno dos axônios e lenta remielinização.

Nas lesões de tipo I, os restos de mielina foram prontamente removidos pelas células fagocíticas e, em 15 dias p.i de BE, a remielinização se mostrava bem avançada. O processo ocorreu mais rapidamente nas lesões de tipo I, enquanto nas de tipo II o processo foi mais tardio. Nas lesões de tipo III, havia áreas compatíveis com tipo I e II na mesma lesão.

Após injeção de BE na cisterna basal de ratos Wistar adultos, Pereira *et al.*, (1998) constataram o aparecimento de lesões desmielinizantes na superfície ventral da ponte se estendendo à superfície dorsal, com posterior formação de cavidades císticas. As lesões se caracterizaram por espongiose às 24 h p.i. e apresentaram no 3º dia abundante infiltrado macrofágico, sendo a remielinização feita principalmente por OLGs das margens das lesões e evidenciada a partir dos 11 dias. A produção de mielina pelas CS foi observada a partir do 15º dia, em áreas que não continham processos astrocitários e não estavam obrigatoriamente relacionadas com os espaços subpiais e perivasculares.

Bondan *et al.* (1998b) observaram lesões císticas e desmielinizantes no tronco encefálico de ratos Wistar, após a injeção de 10 µl de BE a 0,1 %, contendo macrófagos centralmente, ocasionais restos de mielina no espaço extracelular e axônios desmielinizados. Na periferia das lesões, a partir do 15º dia p.i de BE, foi evidente a remielinização predominantemente oligodendroglial e marcada reação astrocitária, com

astrócitos imunorreativos para GFAP. Remielinização por CS ocorreu em áreas perivasculares e de espaço extracelular expandido, destituídas de processos astrocitários, estabelecendo-se relação individual com uma única fibra nervosa desmielinizada, ocasionalmente duas ou mais (Bondan et al., 1999).

Na maioria das lesões induzidas pelo BE entre os 3 e os 21 dias na medula espinhal (Graça, 1988b) e 15 a 31 dias no tronco encefálico (Bondan, 1997), foram vistos linfócitos contactando macrófagos carregados de mielina e bainhas de mielina em degradação. Embora seja difícil de explicar a presença de linfócitos em processos induzidos por tóxicos, tal fato mereceu estudo através do emprego de drogas imunossupressoras.

Após aplicações múltiplas de BE em diferentes pontos da medula espinhal de ratos Wistar, Fernandes *et al.* (1997) provocaram desmielinização primária focal com preservação das estruturas vasculares, verificando que o tipo de lesão observada não é dose dependente e sugerindo que, após múltiplas agressões, há modificação na capacidade do SNC responder à estimulação inflamatória, mas não há variação no padrão de remielinização.

Após agressões múltiplas e seqüenciais com BE na medula espinhal de ratos Wistar, Fernandes *et al.*, 1998 não observaram evidências de que os episódios repetidos de quebra da barreira hematoencefálica e a exposição prolongada do tecido nervoso ou de mielina vesiculada ao sistema imune tenham sido suficientes para desencadear uma reação imunomediada. Os linfócitos constituíram um achado esporádico e não houve formação de manguitos perivasculares.

Bondan *et al.* (1998a, 2000), na tentativa de modular farmacologicamente o processo remielinizante no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos experimentalmente ao modelo gliotóxico de BE, utilizaram nesses animais, dois agentes imunossupressores: ciclofosfamida (CY) e ciclosporina (CsA). O emprego de tais agentes modificadores da resposta imune-inflamatória induziu variações na biologia de reparo do tecido nervoso pós-injeção do gliotóxico. Os autores não encontraram evidências, no entanto, de que as alterações celulares observadas tenham resultado diretamente de vias relacionadas com a supressão da atividade linfocitária.

O tratamento com o agente alquilante CY ocasionou atraso no processo de reparo geral da lesão induzida pelo gliotóxico, com remielinização oligodendroglial incipiente e restrita, predomínio de axônios desmielinizados, menor neovascularização e poucos linfócitos. Atraso na atividade dos macrófagos foi observado através dos achados de MDMs no centro da lesão até os 31 dias p.i. de BE. A CY não afetou a resposta de ASTs p.i de BE, nem a atividade invasiva e remielinizante das células de CS (Bondan *et al.*, 2000).

O tratamento com CsA não alterou o padrão do processo de remielinização e de reparo da lesão, apresentando-se semelhante ao dos animais imunocompetentes e persistindo o achado de infiltração linfocitária. A característica mais proeminente induzida pelo tratamento com CsA foi a presença de alta densidade de OLGs, pequenos e arredondados, muitas vezes dispostos em grupos próximos aos axônios remielinizados da periferia da lesão e apresentando longas cisternas paralelas de retículo endoplasmático, sugestivas de intensa atividade de síntese (Bondan *et al.*, 1998b).

Um possível tratamento para EM é o transplante de células gliais (OPCs), e com esse objetivo Smith & Franklin (2001) estudaram o efeito da imunossupressão na remielinização espontânea do SNC após desmielinização induzida pela administração de BE. Os autores criaram lesões desmielinizantes na medula espinhal de ratos adultos e compararam a extensão de remielinização, administrando dois tratamentos imunossupressores, CsA e CY. Verificaram que a CY reduziu significativamente a área remielinizada, sugerindo que esse fármaco deve ser utilizado com cautela em pessoas com doenças desmielinizantes como EM.

Levine & Reynolds (1999), aplicaram BE no quarto ventrículo de ratos e observaram morte de OLGs com destruição de mielina, devido ao dano ao DNA mitocondrial. Verificaram, também, perda de ASTs no local afetado, com importante implicação para a remielinização da área. Analisaram a reação da população de células gliais precursoras de OLGs (OPCs) nas áreas desmielinizadas após a injeção do gliotóxico, constatando que em 22 h p.i. houve um decréscimo de 21% no número de OPCs nos tratos afetados. As células sobreviventes apresentavam-se reativas com espessamento citoplasmático, poucos prolongamentos e vesículas na membrana. Dois dias p.i. de BE, OPCs reativos haviam aumentado em número, sendo maior o número

entre 6 –10 dias p.i., quando a desmielinização estava completa. Marcador de mielina foi observado 12 a 15 dias p.i. de BE nos axônios desmielinizados e a remielinização ocorreu até 40 dias p.i. Nesse período, as células OPCs exibiam uma morfologia estrelada e um aumento no número de seus prolongamentos, muitos dos quais associados com axônios marcados para neurofilamentos. Os autores concluíram que a desmielinização induzida pelo gliotóxico gerou um número suficiente de OPCs para participar no reparo das lesões desmielinizantes.

No modelo de BE, a remielinização pode ser completa na medula espinhal (Graça & Blakemore, 1986; Graça, 1988a), onde ocorre às expensas de CS. No tronco encefálico é incompleta e ainda há formação de cavidades císticas multiloculares (Bondan *et al.*, 2000). A diferença de comportamento do tecido nervoso nas duas regiões deve-se ao fato de que na medula espinhal há acesso direto de CS- das raízes dorsais, dos nervos meníngeos- e menor número de ASTs (Bignami & Dahl, 1994); no encéfalo há maior número de ASTs e células precursoras de OLGs (Ludwin, 1979; Bignami & Dahl, 1994; Keirstead & Blakemore, 1999; Frost *et al.*, 2000).

Embora sejam constatadas falhas na reparação completa da mielina, seja pela paucidade de OPCs disponíveis ou pela hipertrofia de AST, o modelo do BE tem sido muito útil para estudar morfologicamente o comportamento individual das células gliais nas diferentes fases das lesões.

3. TRABALHO 1

Glial Fibrillary Acidic Protein-labelled astrocytes following ethidium bromide injection in the brain stem of normal and immunosuppressed Wistar rats

Running title: GFAP-labelled astrocytes in toxically-demyelinated Wistar rats

Submetido ao periódico: Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Glial Fibrillary Acidic Protein-labelled astrocytes following ethidium bromide injection in the brain stem of normal and immunosuppressed Wistar rats

Running title: GFAP-labelled astrocytes in toxically-demyelinated Wistar rats

Eliza Simone Viégas Sallis¹, Eduardo Fernandes Bondan², Maria Anete Lallo², Luis Antonio Violin Pereira³, Fabíola Arrotéia³, Maria Lúcia Zaidan Dagli⁴, Melissa Sanchez⁴, Aline de Marco Viott¹, Adriano Tony Ramos¹, Dominguita Lühers Graça⁵.

Acknowledgements: CNPq, 521000/99-8 and 305756/2-6

¹PPPGMV, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil; ²Departamento de Veterinária, Universidade Bandeirante, São Paulo, SP, Brasil; ³Departamento de Histologia e Embriologia, UNICAMP, SP, Brasil; ⁴Departamento de Patologia Veterinária, FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil; ⁵Departamento de Patologia, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

.Author for correspondence: D.L. Graça, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS – Fax: 55 3220 8284 – E-mail: dlgraca@smail.ufsm.br

Abstract

Segmental demyelination was induced in Wistar rats with ethidium bromide (EB), an intercalating dye of the phenanthridine family, that selectively destroys neuroglial cells of the central nervous system (CNS) after local injection, notably astrocytes. Twelve adult Wistar rats received a single intracisternal injection of 10 μ l of 0.1% EB in 0.9% saline while immunosuppressed with cyclophosphamide. Control rats received either an intracisternal injection of 10 μ l of 0.9% saline (n=6) or 10 μ l of 0.1% EB without an immunosuppressive treatment (n=12). Cyclophosphamide (CY) was given intraperitoneally twice weekly, 50 and 30 mg/kg respectively with a 3 days interval, after the intracisternal injection of EB or saline during the experimental period. The rats were killed by intracardiac perfusion of buffered 10% formalin under deep anesthesia at 1, 2, 3, 7, 14 and 21 days after injection (a.i.). Brain stem sections were collected for glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunohistochemistry. Demyelinated lesions were observed along the brain stem although were more marked at the pons. The lesion evolved from a hectic macrophagic myelin breakdown and removal leaving sheath-deprived axons at 7 days after injection (a.i.) to cell proliferation intermingled with cystic cavities lined by astrocytic processes by day 21 a.i. GFAP-labelled hypertrophic processes were depicted within the lesions of normal likewise immunosuppressed rats injected EB although more exuberant in the latter. The significance of that difference though could not be definitely established because of the wide range of scores detected among the lesions. The difference may point to the importance of the early inflammatory events after EB injection.

Key words: demyelination, remyelination, GFAP, ethidium bromide, cyclophosphamide

Introduction

Astrocytes are the larger and more abundant glial cells of the CNS of mammals. They are scattered within white and gray matter composing up to 50% of the total nervous volume (1). Their conspicuousness reflects their importance for the tissue. From studies of the rat optic nerve made by Raff and colleagues (2) it was learnt the existence of two astrocytic types, I and II. Type I astrocytes, the first to differentiate, control the differentiation of another lineage, the O-2A, which gives rise to Type II astrocytes and oligodendrocytes.

Whereas most of the known astrocytic functions, such as controlling of the tissue homeostasis, induction of the BBB and the microglial phenotype, production of the glial scar, detoxification of deleterious substances, formation and controlling of the glial limitans and vascular end-feet, regulation of synaptogenesis (3) and synaptic transmission (4), among others, are provided by Type I astrocytes (5), activities concerning myelination and conduction are provided by oligodendrocytes and Type II astrocytes (6).

In multiple sclerosis (MS), the paradigm of human demyelinating diseases, there is loss of the myelin sheaths and defective remyelination. Many reasons lead to the lack of restoration of myelin sheaths and conduction in MS, since the process may be recurrent or progressively damaging to the tissue, ending on the loss of the axon itself (7). The etiology is unknown but it is known that an autoimmune mechanism

contributes to the major lesions together with a marked astrocytic gliosis that interferes with restoration of tissue morphology and function (8).

To mimic the loss and recovery of myelin sheaths that happen in MS, an experimental model of demyelination was designed, using ethidium bromide (EB), a gliotoxic intercalating dye that selectively damages astrocytes and oligodendrocytes. EB induces an acute loss of myelin, following oligodendrocyte loss, which can be reverted from 7 days after injection when Schwann cells invade the CNS following astrocytes disappearance (9), and by 13 days a.i. when oligodendrocytes start replacing the lost internodes. Remyelination may be complete by 30 days a.i. (10) and it is always possible to detect astrocytic hypertrophy along the needle track, round the center of the lesions (11).

Considering that lymphocytes are always found within EB-induced lesions, and immunosuppressive therapy has been used to treat MS although with controversial results (12), an investigation was carried out using pharmacological interference in the EB model of demyelination. Immunosuppressive drugs such as cyclosporine A which resulted in lesions similar to the observed in the normal rats (13). Cyclophosphamide (12) and dexamethasone (14) appeared to delay macrophagic scavenging activity and oligodendroglial remyelination of lost CNS internodes without interfering with Schwann cell invasion or astrocytic reaction following EB injection in the brain stem of Wistar rats. To define if there is any difference between the astrocytic response in normal and immunosuppressed Wistar rats this study was performed.

Material and Methods

Thirty male Wistar rats 4 to 5-months-old were used. Twelve Wistar rats received a single intracisternal injection (*cisterna pontis*) of 10 µl of 0.1% ethidium bromide in 0.9% saline while immunosuppressed with cyclophosphamide (Genuxal®) (Group 1). In group 2 12 rats received an intracisternal injection of 10 µl of EB in 0.9% saline solution. Six rats of group 3, were injected 10 µl of 0.9% saline. For the intracisternal injections the rats were anesthetized with an admixture of ketamine and xylazine (5:1, 0,1 ml/100g) and a burr-hole was made on the right side of the skull, 8 mm rostral to the fronto-parietal suture. The injections were carried out according to Pereira et al (1998) with a Hamilton syringe inserted through the burr-hole in a vertical position and the solution freed when the tip of the needle reached the base of the skull to bath the pons. The wound was sutured and the animals allowed to recover. Cyclophosphamide was administered in two weekly doses (50 and 30 mg/kg respectively) with an interval of at least 3 days during the experimental period. The rats were killed by intracardiac perfusion of buffered 10% formalin under deep anesthesia at 15, 21 and 31 days a.i. Brain stem sections were collected, immersed in 10% buffered formalin, dehydrated and embedded in paraffin wax by standard methods. Sections (5µm) were cut and stained with haematoxylin and eosin. Selected sections of these tissues were collected on glass slides pretreated with 4% sylvane, dewaxed and rehydrated in graded ethanol baths. The method used for the GFAP immunolabelling was the avidin-biotin complex (15). The sections were incubated during 16 hours at 4° C with the polyclonal primary antibody anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFAP, Dako Co, Carpinteria, California, USA) 1:1000. The sections were incubated for 30 minutes with

a biotinylated secondary antibody (goat anti-mouse/rabbit Ig, Duet kit Dako) 1:400, and with the complex streptavidin-biotin-peroxidase (StreptABCComplex/HRP Duet kit, Mouse/rabbit, Dako) for 30 minutes. The immunoreactivity was observed using diaminobenzidine (DAB -Sigma Biosciences, St Louis, USA) 0.1% as the chromogen and H₂O₂ 0.5%. The sections were counterstained with Harris hematoxylin, dehydrated in graded ethanol baths, mounted under cover slips and observed by light microscopy. Counting of the GFAP labelled area in 21 day-lesions was made with an Image Pro Plus 4.5 system (Media Cybernetics).

Results

As seen in H&E stained sections, the demyelinated lesions had varied extension along the brain stem with the most marked changes at the pons where ventrally occupied 1/3 to 1/2 of the tissue close to the meninges.

In EB injected rats status spongiosus followed the injection due to edema of the cells, early disappearance of astrocytes and expansion of the extracellular space. By day 7 a.i. foamy macrophages were conspicuous within the lesions leaving naked axons behind for the remyelination by oligodendrocytes.

The aspect of the lesions were very much alike in normal and cyclophosphamide-immunosuppressed rats regarding GFAP astrocytic labelling. At 14 days a.i. slender astrocytic processes were depicted that gradually became vigorous by day 21 a.i. and were located at the edges of the lesions and along the needle track. GFAP positivity was observed as a refringent brown discoloration of the processes

contrasting with the mild blue of the nuclei (Figure 1). Distribution of the processes were consistent with isomorphic gliosis.

Extent of GFAP labeled areas at 21 days, showed that for group 1 (BE+CY) the mean area was 74,949 μm^2 , while for group 2 (BE), the mean area was 44,816 μm^2 , and for group 3 (Sal+CY) the mean area was 26,258 μm^2 (Figure 2).

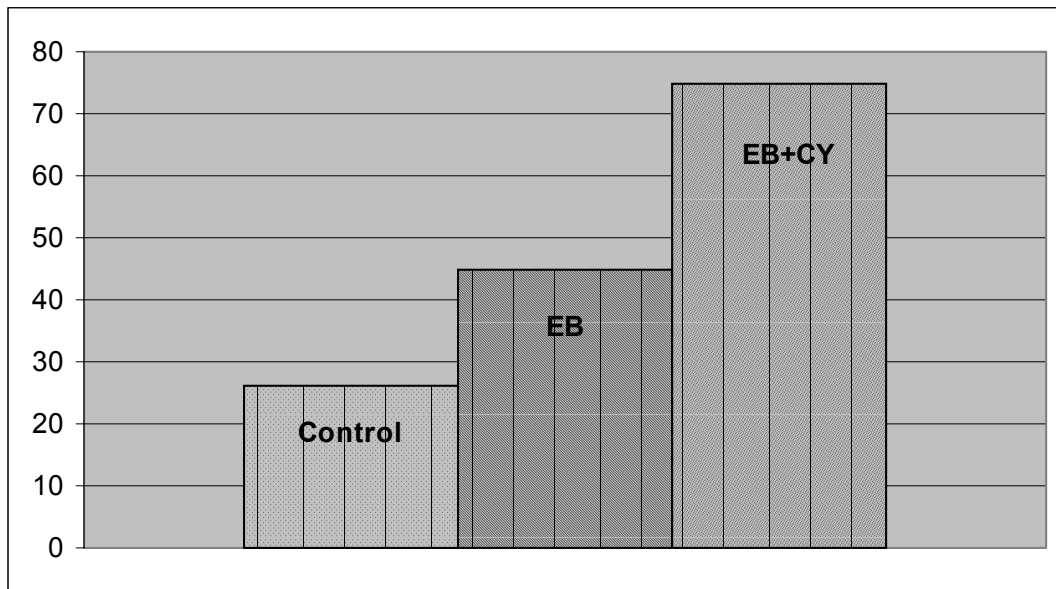


Figura 2. Mean area (μm^2) of GFAP labelling in 21 day-old lesions.

Control

EB: ethidium bromide

CY: cyclophosphamide

By day 21 a.i. small cystic cavities had formed which were lined by hypertrophic astrocytic processes and conspicuous blood vessels. Few if any phagocytic cells were observed within those cavities. When the lesions occurred underneath de pia, hypertrophy of the meninges was observed.

Discussion

Demyelination induced by EB is followed by remyelination by either Schwann cells or oligodendrocytes (16). The relative distribution of both myelinating cells depends respectively on the absence or presence of astrocytes within the tissue (9). When astrocytes are killed by EB at the early hours after the drug injection, an expansion of the extracellular space takes place due the astrocytic absence, and the boundaries of the CNS are exposed to the peripheral nervous system (PNS) when it is allowed the free entrance of Schwann cells (10,13,17).

The lesions induced by EB in cyclophosphamide-immunosuppressed rats develop more slowly than with EB injection alone due to the pharmacological modulation of the macrophagic activity made by the drug (12). Thus astrocytes are more stimulated to act in a expanded extracellular space full of decaying myelin membranes.

In electron microscopy (EM) studies, astrocytic proliferation is detected at about 13 days a.i. (9). This proliferation however is scant and mitotic astrocytes are barely seen. On the contrary, hypertrophy of astrocytes is observed under EM and in GFAP-labelled cells (11). Astrocytic gliosis was interpreted as the cell reaction to control the large expansion of the interfascicular extracellular space.

Astrocytic GFAP labelling within the lesions was significantly different from the labelling observed in spontaneous canine distemper lesions when the cells showed a marked increase in the cell body as well as in the processes (18). Canine distemper is a viral disease (CDV, Morbillivirus, Paramyxoviridae) (19) that has been used as an animal model for MS as CDV was once considered as a putative factor in the initiation

of the disease (20). Likewise MS, canine distemper courses under many nervous forms (19).

In EB induced demyelination, the evolution of the lesions followed a pattern with few variations that reflect the CNS limited capacity of response to a toxic stimulation (21). Either in normal or cyclophosphamide-immunosuppressed Wistar rats the evolution is rather similar with most differences concerning the observation of activated oligodendrocytes in the latter as described by Bondan et al (13). In all lesions astrocytic hypertrophic processes merge at the center of the lesions to restore homeostasis.

Extent of GFAP labeling as seen at 21 days a.i. covers a larger mean area in group 1 lesions (BE+CY). This fact must be regarded cautiously because of the broader spectrum of results among the lesions within the treatments. It was observed in this study as in the EB lesions in the spinal cord (9) that the early inflammatory events a.i. guide the development in either slow or fast lesions. There is no reason for that event to be different within the brain.

There is astrocyte hypertrophy in EB injected normal and immunosuppressed rats, although more marked in the latter. If this fact is confirmed in a larger number of samples, the use of immunosuppressive agents must be prudently performed in order to avoid worsening of the ongoing pathology. If used in diseased patients clinical improvement is at risk.

If astrocytic hypertrophy is not significantly different among the lesions this may be interpreted as a conservative behavior of a cell responsible for most normal and pathological activities within the tissue (3).

Acknowledgements

The authors appreciate the technical assistance of Maria Andreia Inkelmann and João Francisco Nunes.

References

1. Montgomery DL (1994). Astrocytes: form, functions and roles in diseases. *Veterinary Pathology*, 31: 145-167.
2. Raff MC, Miller RH, Noble M (1983). A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 303: 390-396.
3. Ransom B, Behar T & Nedergaard M (2003). New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neurosciences*, 26: 520-522.
4. Newman EA (2003). New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, 26: 536-542.
5. Miller RH, David S, Patel R, Abney ER, Raff MC (1985). A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: *in vivo* evidence for two distinct astrocyte lineages. *Developmental Biology*, 111: 35-41.
6. Butt AM, Duncan A, Hornby MF, Kirvell SL, Hunter A, Levine JM, Berry M (1999) Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia*, 26: 84-91.

7. Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N (2002). Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Current Opinion on Neurology*, 15: 227-231.
8. Brosnan CF, Raine CS (1996). Mechanisms of immune injury in multiple sclerosis. *Brain Pathology*, 6: 243-257.
9. Graça DL, Blakemore WF (1986) Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 12: 593-605.
10. Pereira LAV, Dertkigil MSJ, Graça DL, Cruz-Höffling MA (1998). Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 30: 341-348.
11. Bondan EF, Lallo MA, Dagli MLZ, Sanchez M, Graça DL (2003). Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 61: 642-649.
12. Bondan EF, Lallo MA, Senhorini IL, Pereira LAV, Graça, DL (2000). The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. – *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 30: 603-612.
13. Bondan EF, Lallo MA, Graça DL (1998) Desmielinização experimental por brometo de etídio no sistema nervoso central. *Revista da Universidade de Guarulhos*, 5: 19-32.
14. Bondan EF, Lallo MA, Baz EI, Senhorini IL, Graça DL (2004). Estudo ultra-estrutural do processo remielinizante pós-injeção de brometo de etídio no tronco

- encefálico de ratos imunossuprimidos com dexametasona. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 62: 131-138.
15. Hsu S-M, Raine CS, Fanger H (1981). A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *American Journal of Clinical Pathology*, 75: 734-738.
16. Graça DL, Bondan EF, Pereira LAVD, Fernandes CG, Maiorka PC (2001). Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arquivos de Neuro Psiquiatria*, 59: 358-361.
17. Fernandes CG, Graça DL, Pereira LAVD (1997) Desmielinização e remielinização após múltiplas injeções intramedulares de brometo de etídio em ratos Wistar. *Arquivos de Neuro Psiquiatria*, 55: 452-459.
18. Headley SA, Soares IC, Graça DL (2001). Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-immunoreactive astrocytes in dogs infected with canine distemper virus. *Journal of Comparative Pathology*, 125: 90-97.
19. Graça DL, Figuera RA, Fernandes CG, Sallis ESV, Rech RR, Riet-Correa G, Torres MFP (2003). Neurohistopatología. In: Pellegrino F, Suraniti A, Garibaldi L. (Editores). *El libro de Neurología para la práctica clínica*. Inter-Médica, Buenos Aires, Argentina, 601-626.
20. Russell WC & Goswami KK (1983). Antigenic relationships in the Paramyxoviridae- Implications for persistent infections in the central nervous

system. In: Mims CA, Cuzner ML, Kelly RE *Viruses and demyelinating diseases*.
Chap. 9, p.89-99.

21. Fernandes CG, Graça DL, Pereira LAVD (1998). Inflammatory response of the spinal cord to multiple episodes of blood-brain barrier disruption and toxic demyelination in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 31: 933-936.

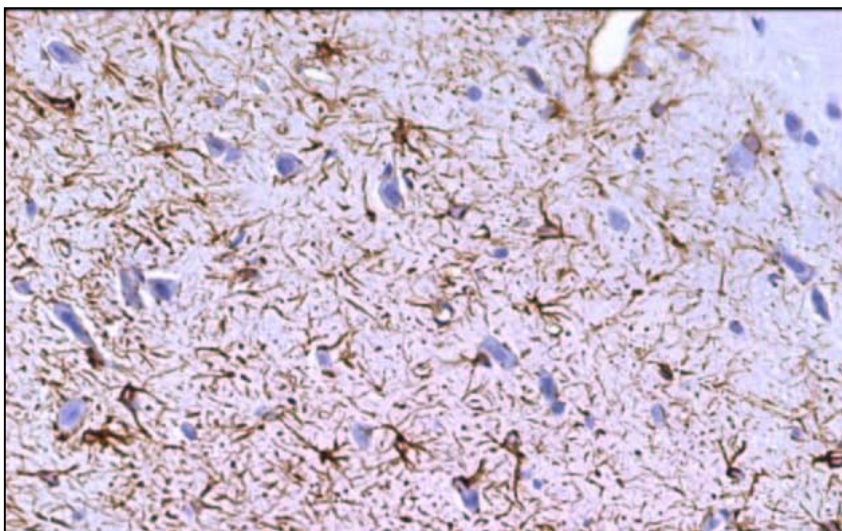
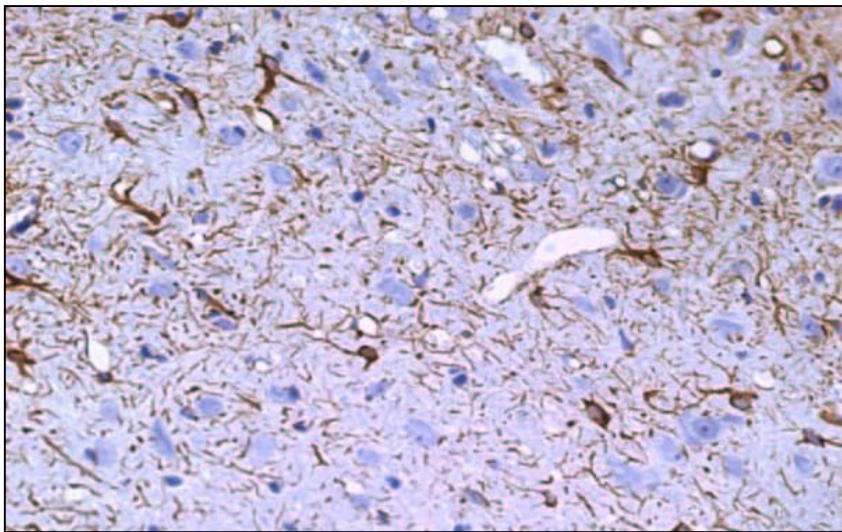
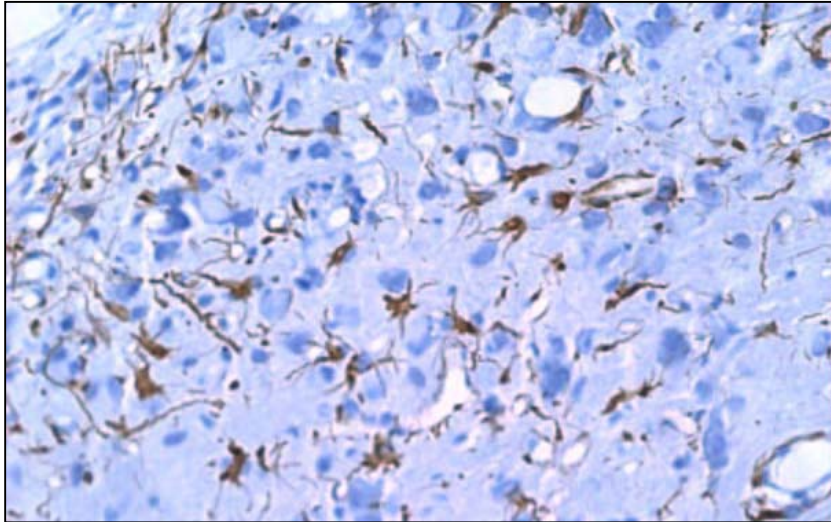


Figura 1: GFAP-labelled astrocytes 21 days after ethidium bromide (EB) injection. **A-** control lesion. **B-** EB induced lesion. **C-** EB and cyclophosphamide induced lesion.

4. TRABALHO 2

OSP-Immunofluorescent remyelinating oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats

Oligodendrócitos remielinizantes positivos para OSP no tronco encefálico de ratos
Wistar desmielinizados toxicamente

Submetido ao periódico: Arquivos de Neuro-Psiquiatria

**Eliza Simone Viégas Sallis¹, Cinthia Melazzo Mazzanti², Alexandre Mazzanti¹,
Luis Antonio Violin Pereira³, Fabíola Arroiteia³, Rafael Fustigatto⁴, Charles
Pelizzari⁴, Aline Rodrigues¹, Dominguita Lühers Graça¹**

OSP-Immunofluorescent remyelinating oligodendrocytes in the brainstem of toxically-demyelinated Wistar rats

Oligodendrócitos remielinizantes positivos para OSP no tronco encefálico de ratos Wistar desmielinizados toxicamente

Eliza Simone Viégas Sallis¹, Cinthia Melazzo Mazzanti², Alexandre Mazzanti¹, Luis Antonio Violin Pereira³, Fabíola Arroiteia³, Rafael Fustigatto⁴, Charles Pelizzari¹, Aline Rodrigues¹, Dominguita Lühers Graça¹

¹PPPGMV da Universidade Federal de Santa Maria; ²PPGBQ da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³ Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP; ⁴ Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. Author for correspondence: Dominguita L. Graça – Departamento de Patologia UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. Fax: 55 32208284

E-mail: dlgraca@smail.ufsm.br

Abstract

CNS remyelination following toxically-induced demyelination is a well known process. Oligodendrocytes constitute the bulk of the myelinating cells in the brain whereas Schwann cells overwhelm oligodendrocytes numbers in spinal cord remyelination. Despite the common knowledge of these facts, we still do not know completely the origin of both remyelinating cells. The present study investigated the participation of mature oligodendrocytes in remyelination after ethidium bromide (EB) induced demyelination in the brain stem of normal and cyclosporin A-immunosuppressed Wistar rats. Thirty adult female rats were divided into three experimental groups. In group 1 the rats received a single intracisternal injection of 10 μ l of 0.1% EB in 0.9% saline (n=10); in group 2 the rats received the EB injection while treated with Cyclosporine A (n=10); in group 3 the rats received a single 10 μ l injection of 0.9% saline while treated with cyclosporine A. The rats were killed at 15, 21 and 31 days after injection. Within the EB lesions, from 15 days onward many cells were positive for OSP (oligodendrocyte specific protein) a marker for mature oligodendrocytes and myelin, round the periphery of the lesions. This cell marking signals that, at least, part of the process of repairing the myelin sheaths is carried out by mature cells of the oligodendrocyte lineage.

KEY WORDS: toxic demyelination, remyelination, oligodendrocytes, OSP, ethidium bromide

Resumo

A remielinização do sistema nervoso central após desmielinização tóxica é um processo bem conhecido. No encéfalo, os oligodendrócitos remielinizam uma área maior do que na medula espinhal, onde as células de Schwann são preponderantes. Embora esses fatos sejam conhecidos, ainda não se sabe com certeza a origem das

células remielinizantes. Para esclarecer a participação de oligodendrócitos maduros na reconstrução das bainhas perdidas, cortes de tronco encefálico de ratos Wistar injetados localmente com brometo de etídio (BE) foram corados com OSP (proteína específica do oligodendrócito), marcador de oligodendrócitos e mielina. Trinta ratos Wistar fêmeas adultas foram divididas em três grupos; no grupo 1, 10 ratos receberam uma injeção de 10 µl de brometo de etídio (BE) em 0.9% salina na cisterna basal; no grupo 2, 10 ratos receberam uma injeção de BE e tratamento com ciclosporina A; no grupo 3, os ratos receberam uma injeção de 10 µl de 0,9% salina e tratamento com ciclosporina A. Os ratos foram sacrificados aos 15, 21 e 31 dias pós-injeção. A partir dos 15 dias, os ratos inoculados com BE mostraram Imunofluorescência positiva para OSP na periferia das lesões. Assim, foi possível comprovar que células maduras da linhagem oligodendroglial participam do processo de remielinização neste modelo gliotóxico.

PALAVRAS-CHAVE: desmielinização tóxica, remielinização, oligodendrócitos, OSP, brometo de etídio

Introduction

Oligodendrocytes are the myelin-producing cells of the central nervous system (CNS). They occur in both the gray matter- as satellites for neurons- and the white matter- as interfascicular cells. Yet, satellite cells have the potentiality to form myelin¹.

Demyelination (loss of myelin of intact axons) due to local injection of gliotoxic agents proved to be useful to study the pathogenesis of remyelination². Among those agents, the fluorescent dye ethidium bromide (EB) has been used to induce demyelination in Wistar rats: within the spinal cord^{3,4}, within the brain^{5,6} and, within the sciatic nerve⁷. In the CNS remyelination was carried out by oligodendrocytes and Schwann cells³.

Bondan et al^{6,8} investigated the response of immunosuppressed Wistar rats to a local injection of EB in the pons. The rats treated with either cyclophosphamide or cyclosporin-A showed partial remyelination by oligodendrocytes and occasional Schwann cells intermingled with cystic cavities. At the time of the investigation, the origin of the remyelinating oligodendrocytes was not known.

It was the aim of this study to find out if the remyelinating cells were mature or immature oligodendrocytes by marking the cells with OSP⁹. OSP (oligodendrocyte-specific protein) is a transmembrane protein, the third most abundant CNS myelin protein contributing to 7% of the total myelin protein¹⁰, and expressed in mature cells and myelin.

Material and methods

Thirty female Wistar rats (250-300 g) were used. In group 1 the rats received 10 µl of 0.1% EB in 0.9% sterile saline in the basal cisterna; in group 2, the rats received the EB injection and were immunosuppressed with cyclosporin-A, in group 3, the rats received 10 µl of sterile saline and were treated with cyclosporine A.

For the surgery the rats were anesthetized with ketamin and xylazine (5:1; 0.1 ml/100 g) and a burr-hole was made on the right side of the skull, 0.8 cm rostral to the fronto-parietal suture. The injections were made according to Pereira et al⁵, with a hand-held Hamilton syringe through the burr hole in a vertical position and the contents freed when the needle reached the base of the skull, into the basal surface of the pons. The skin was sutured and the rats allowed to recover. The rats from group 2 were injected cyclosporin A (Sandimun®) intraperitoneally, 10 mg/kg on a daily basis for seven days and subsequently three times a week with a 48 h interval. The first cyclosporin A injection was made soon after surgery. The rats were maintained in collective cages (3-5 rats) and fed ration and water ad libitum.

For each group the rats were perfused under deep anesthesia with 10% buffered formaline via the left ventricle at 15 (3) 21 (4) and 30 days (3). Brain stem coronal slices with the lesion were separated into two matching portions: one was immersed in TissueTek© and frozen at -80 C, the other half was embedded in paraffin for routine processing.

For the immunofluorescence studies: Eight to 12 µm frozen sections were obtained in a cryostat and post-fixed with methanol for 2 minutes at -20°C. Non-specific sites

were blocked with TBS/BSA 1% for 30 minutes, RT. Rinse with TBS. Permeabilization with TBS, BSA and Triton for 30 minutes. Incubation with anti-OSP primary antibody (abcam) (1:100) diluted in TBS, BSA and Triton overnight. Rinse with TBS. Incubation with fluorescent anti-rabbit secondary antibody (FITC) (1:100), diluted in TBS, dark, for 60 minutes. Rinse in TBS, dark. Mounting in vectashild fluorescent medium. Blocking of the glass coverslips with enamel.

Fluorescence was observed with a Nikon fluorescence photomicroscope and the images were processed in the Image software Adobe Photoshop.

Paraffin embedded tissues were trimmed at 6 μm , dehydrated with increased concentrations of ethanol, stained with hematoxylin and eosin and Weill staining, mounted in Entellan© with glass coverslips and studied and photographed under an Olympus BX41 light microscope.

Results

Ethidium bromide induces a demyelinating lesion following destruction of glial cells. Details of the early lesions may be found elsewhere^{3,4,5,6}.

Naked axons undergo remyelination by oligodendrocytes and occasional Schwann cells. Within the brain, most of remyelination is carried out by oligodendrocytes that are firstly recognized in the lesions around day 13 after EB injection⁶. In H&E lesions of this investigation, many round nuclei cells, slender cell processes and abundant gitter cells were found at 15 days a.i. Weill staining emphasized new myelin being produced as the lesions developed.

In normal Wistar rats as well as cyclosporine-A-immunosuppressed Wistar rats, remyelination is well advanced at 21 days after EB injection. Many cells relate to axons and thin new sheaths may be seen (Figure 1). From 15 days onward OSP-immunofluorescent oligodendrocytes were conspicuous within the lesions. A strong immunofluorescence marked broadly branched cells (Figure 2) that extended processes toward the naked axons where repair of myelin sheaths is under way. Immunofluorescent protein localized primarily to the outer membranes and appeared as concentrated on the cell body as on the processes.

Some round cells within the tissue, interpreted as immature oligodendrocytes in EM studies⁸ did not stain positive for OSP. Both, mature and immature cells in normal as in immunosuppressed rats, lied in areas where astrocytic processes were conspicuous.

The lesions induced by the saline injection together with cyclosporine A treatment consisted on a mild traumatic lesion along the needle track.

Discussion

CNS demyelination induced by EB is followed by remyelination by oligodendrocytes and Schwann cells. The area of Schwann cell remyelinated sheaths is larger in the spinal cord than in the brain due to regional differences in numbers of astrocytes within the CNS¹¹, since the early disappearance of astrocytes and the glial limiting membrane allows Schwann cells to invade the CNS^{12,13}.

Once oligodendrocytes become the main myelin repairing cells within the brain, it is relevant to find out if they are either mature or immature cells.

In EB-induced lesions in the brain of normal Wistar rats oligodendrocytes remyelinate over the narrow area lining the normal tissue⁵, suggesting that mature cells with a functional reserve rebuild the sheaths.

After EB injection in cyclosporine A-immunosuppressed Wistar rats, an ultrastructural study showed that many round oligodendrocytes with large amounts of rough endoplasmic reticulum approach the naked axons. These cells are very suggestive of immature oligodendrocytes⁸, which could be derived from a common progenitor that gives rise to astrocytes and oligodendrocytes¹⁴. Confirmation of their condition of newly differentiated cells of the lineage may be provided by NG2 labelling¹⁵.

The fact that some oligodendrocytes stain positive for fluorescent OSP show that mature cells from the tissue constitute a source to remyelinate the demyelinated axons. It is proposed that these mature cells initiate remyelination while newly differentiated cells reach the maturity to proceed the repair of lost sheaths.

Both cells, mature and immature, and in normal and immunosuppressed animals, lie in areas where astrocytic processes are conspicuous, confirming the need of

astrocytes as the third element of the CNS for a stable relationship between axons and oligodendrocytes¹³.

In chronically demyelinated lesions as those of multiple sclerosis, the lack of remyelination may be ascribed to the unchecked chronic immune reaction as well as to the glial scar that interferes with the cells migration toward the myelin-demanding naked axons. The discovery of progenitor oligodendrocytes within the adult brain even within multiple sclerosis lesions¹⁶, brought in some hope although the complex molecular environment in which remyelination takes place remains largely unknown. Molecular biology techniques may be of great help to find out which factors concerning remyelination are dysregulated in either chronically or recurrently demyelinated lesions¹⁷.

Sources and Manufacturers

Sandimmun – Sandoz S/A, Pharmaceutical Division, São Paulo, SP

Tissue Tek – Erviegas, São Paulo, SP

Weill Easy Pack – Erviegas, São Paulo, SP

Entellan – Merck KgaA, Damstadt, Germany

Acknowledgements

The authors appreciate the technical assistance of Maria Andreia Inkelmann, DVM and João Francisco Nunes.

References

1. Ludwin SK. The function of the perineuronal satellite oligodendrocyte: an immunohistochemical study. *Neuropath Appl Neurobiol* 1984;10:143-149
2. Woodruff RH, Franklin RJM. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of lysolecithin,

- ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *Glia* 1999;25:216-228
3. Graça DL, Blakemore WF. Delayed remyelination of rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropath Appl Neurobiol* 1986;12: 593-608
 4. Fernandes CG, Pereira LAV, Graça DL. Inflammatory response of the spinal cord to multiple episodes of blood-brain barrier disruption and toxic demyelination in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 1998; 31:933-936
 5. Pereira LAV, Dertkigil MSJ, Graça DL, Cruz-Höfling MA. Dynamics of remyelination in adult rat brain after exposure to ethidium bromide. *J Submicr Cytol Pathol* 1998;30:297-301
 6. Bondan EF, Lallo MA, Sinhorini IL, Pereira LAV, Graça DL. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *J Submicr Cytol Pathol* 2000;32:431-438
 7. Riet-Correa G, Fernandes CG, Pereira LAV, Graça DL. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:99-104
 8. Bondan EF, Lallo MA, Graça DL. Efeitos do brometo de etídio no tronco encefálico de ratos Wistar imunossuprimidos com ciclosporina. *Cad Est Pesq, UNIP* 1998;IV:1-46
 9. Bronstein JM, Popper P., Micevych PE., Farber DB. Isolation and characterization of a novel oligodendrocyte-specific protein. *Neurology* 1996;47:772-778
 10. Bronstein JM, Micevych PE, Cehn K. Oligodendrocyte-specific protein (OSP) is a major component of CNS myelin. *J Neurosci Res* 50:713-720
 11. Sims TJ, Gilmore SA, Waxman SG, Klinge E. Dorsal-ventral differences in the glia limitans of the spinal cord: an ultrastructural study in developing and irradiated rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1985;44:415-429
 12. Franklin RJ, Blakemore WF. Requirements for Schwann cells migration within CNS environments: a viewpoint. *Int J Dev Neurosci* 1993;11:641-649
 13. Graça DL, Bondan EF, Pereira LAV, Fernandes CG, Maiorka PC. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic

- demyelination of the central nervous system. *Arq. Neuropsiquiatr* 2001; 59(B-2):358-361
14. Fushimi S, Shirabe T. The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. *Neurpathol* 2002;22:233-242
 15. Levine JM, Reynolds R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Exp Neurol* 1999;160:333-347
 16. Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD. NG2 positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci* 2000;20:6404-6412
 17. Franklin RJM. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature Rev. Neurosci* 2002. 3:705-71

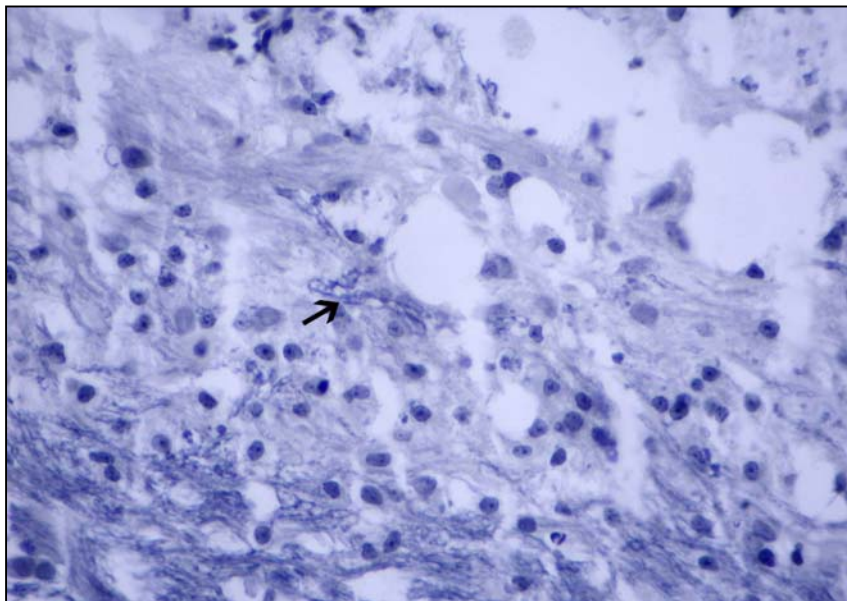
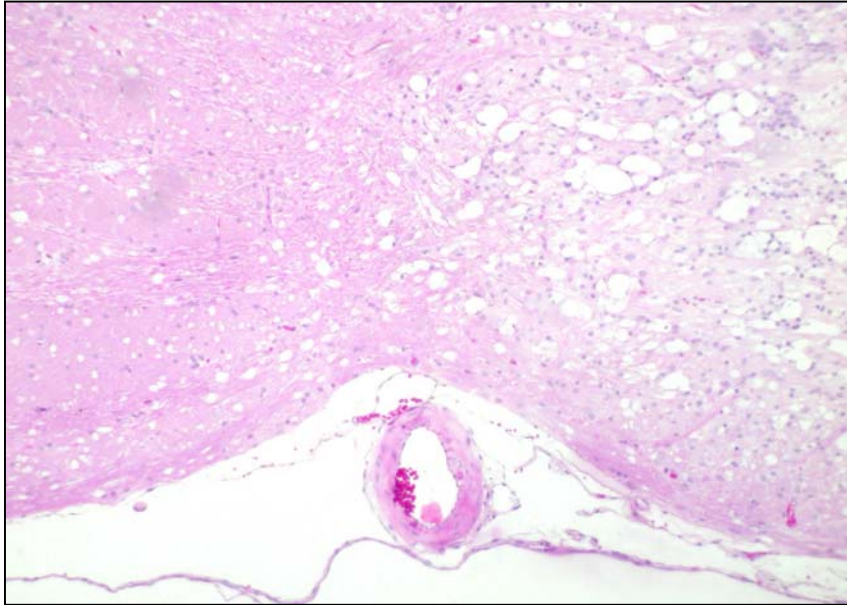


Figure 1. 21 days lesion from a group 2 rat within the pons. **A.** Many cells with round nuclei are depicted in a rather compact lesion. H&E, X160. **B.** New thin myelin sheaths (arrow) stain positive round the boundaries of the lesion. Weill, X200.

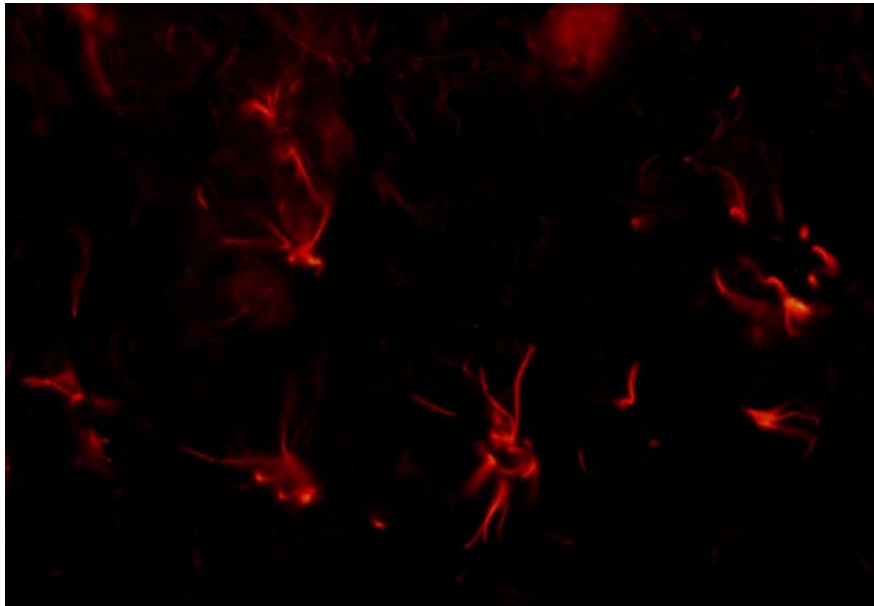


Figura 2. Large broadly branched OSP-immunofluorescent oligodendrocyte from the lesion of figure 1. X400.

5. DISCUSSÃO GERAL

O processo de desmielinização/remielinização do SNC tem sido estudado em modelos tóxicos experimentais (Bondan et al., 1998a; Woodruff & Franklin, 1999). Nesses modelos, o tempo e as características do processo mudam de acordo com a disponibilidade de células remielinizantes, OLGs e CS (Graça et al., 2001), e com a existência de fendas na membrana limitante glial que permitam a entrada de CS no SNC (Franklin & Blakemore, 1993). Na medula espinhal, devido à facilidade de acesso das CS ao neurópilo, a remielinização predominante é realizada por essa glia periférica (Graça et al., 2001). No encéfalo, pela existência de numerosos ASTs (Sims et al., 1985), fendas na membrana limitante glial são mais difíceis de ocorrer. Assim, a remielinização ocorre predominantemente por OLGs, maduros ou imaturos, esses últimos provenientes da diferenciação de precursores da linhagem.

No modelo do BE, os ASTs são destruídos nas primeiras 24 horas após a injeção local, p.i. (Graça & Blakemore, 1986), o que determina a expansão do espaço extracelular e uma invasão acentuada de CS na medula espinhal e limitada no encéfalo.

Os ASTs, células estáveis, recuperam-se lentamente e, eventualmente, pode ser observada alguma dessas células em mitose.

Os ASTs, marcados pela GFAP em lesões induzidas pelo BE mostram positividade aumentada (células reativas) em relação à marcação no tecido normal (Bondan et al., 2003) e corroborada neste estudo. Essa marcação é semelhante à observada em animais desmielinizados pelo BE e imunossuprimidos com CY, embora mais marcada nesta última. A CY é uma droga alquilante, principalmente do DNA, que induz modificações nos ácidos nucleicos (Rang et al., 1995) e interferência no ciclo celular em qualquer fase do mesmo (Seldin & Steinberg, 1988).

Essa interferência no ciclo celular no modelo do BE, manifestou-se através do retardo no desenvolvimento das lesões, observado pela presença de grandes quantidades de mielina vesiculada no espaço extracelular (Bondan et al., 2000) mesmo aos 31 dias p.i. Tal fato foi interpretado como uma pobre atividade macrofágica nas lesões de

desenvolvimento lento descritas por Graça & Blakemore (1986). A permanência de detritos mielínicos, embora com números adequados de macrófagos nas lesões (Bondan et al., 2000), além de retardar a progressão da lesão, inibiu a atividade de reparação das bainhas perdidas, já que OLGs não remielinizam em áreas onde os axônios não estão nus (Graça & Blakemore, 1986). A presença de mielina extracelular, acompanhada de acúmulo de moléculas deletérias cuja atividade deva ser modulada (Ransom et al., 2003) na ausência de atividade remielinizante é estímulo suficiente para a hipertrofia astrocitária.

A hipertrofia acentuada observada nas lesões dos ratos imunossuprimidos com CY obedeceu a um processo de desmielinização tardia por inatividade macrofágica, o que determinou remielinização impedida, tanto pela ação astrocitária quanto pela incapacidade oligodendroglial de alcançar os axônios desmielinizados. Adicionalmente, se a atividade macrofágica é diminuída por CY, os fatores tróficos que os macrófagos secretam em prol da remielinização (Franklin, 2002) também estão comprometidos. Em conjunto, o ambiente é propenso à hipertrofia astrocitária.

A reação astrocitária é exuberante no modelo do BE, com marcada hipertrofia dos processos, sem evidência notória de astrocitose (Bondan et al., 2003) ou menção sobre a expansão do corpo celular, situação diferente à observada por Headley et al. (2001) ao marcar astrócitos com GFAP em lesões espontâneas induzidas em cães pelo vírus da cinomose. Nos cães, a marcação pronunciada por GFAP incluía o corpo celular. Nas lesões imunoinflamatórias da cinomose, existem os componentes moleculares como fatores neurotróficos, concentrações enzimáticas e expressão de moléculas do MHC como determinantes do grau de imunorreatividade à GFAP (Headley et al., 2001) que não ocorrem no modelo do brometo de etídio que, comprovadamente, não elicita uma resposta imunomediada persistente (Fernandes et al., 1998).

Em lesões em que a reação inflamatória que acompanha a injeção de BE é insuficiente (Graça & Blakemore, 1986) ou impedida farmacologicamente (Bondan et al., 2000; 2004), a presença de macrófagos tardios ou funcionalmente impedidos no momento em que a desmielinização terminou, constitui estímulo maior à proliferação astrocitária à formação de cicatriz glial (Franklin, 2002). A proposta, portanto, é a de

que a cicatriz glial é a consequência de uma remielinização falha mais do que um obstáculo à sua ocorrência.

Os ASTs como as células moduladoras por excelência do tecido nervoso respondem com proliferação variada a estímulos nocivos, que no presente modelo iniciaram quando do desaparecimento dessas células nas fases precoces após injeção de BE. A resposta astrocitária muda na medida em que o processo de desmielinização é retardado por fatores relacionados à resposta inflamatória envolvendo macrófagos e essa mudança se traduz no aumento da gliose.

Os OLGs, que são células pós-mitóticas, desaparecem das lesões até as 72 horas p.i. A partir desse momento, ocorre a invasão das CS, que pode ser proeminente aos 7 dias p.i. (Graça, 1989a) com remielinização avançada aos 11 dias p.i. na medula espinhal, e com início de remielinização por OLGs a partir dos 13 dias p.i. O desenvolvimento das lesões induzidas pelo BE segue um curso padrão, somente modificado por eventos locais na hora da injeção do tóxico, que reconhecidamente induz, além de destruição das células da glia, inflamação inespecífica local (Graça & Blakemore, 1986).

Em relação aos OLGs, foi possível comprovar que células maduras da linhagem, marcadas pelo anticorpo anti-OSP, realizam a tarefa de remielinização. Pesquisas anteriores sugeriam essa participação das células maduras (Graça, 1989b) embora existisse a hipótese de participação de células precursoras no processo (Peireira et al., 1996).

O fato comprovado acima, não exclui a participação de células recém diferenciadas dos precursores, já que oligodendrócitos arredondados, descritos como jovens e ativados por Bondan *et al* (1998b), não foram marcados pela OSP.

Fushimi & Shirabe (2002) marcaram células jovens e maduras em camundongos desmielinizados por BE. Os autores marcaram as células jovens com mRNA para PDGF α R (receptor para fator ativador de plaquetas) e as maduras com mRNA para PLP (proteína proteolípídica). Raras células marcaram-se com ambos os marcadores a partir da primeira semana pós-desmielinização. Esses autores concluem que há disponibilidade de células jovens no tecido. À semelhança do observado na presente investigação, as células maduras ocorreram na periferia das lesões, adjacentes ao tecido

normal. Tal fato tem sido observado em múltiplas variantes do modelo de desmielinização do brometo de etídio (Graça & Blakemore, 1986; Fernandes et al., 1997; Pereira et al., 1998; Bondan et al., 1998a).

A existência de oligodendrócitos maduros com reserva funcional para realizar a remielinização não é motivo de grande expectativa para as doenças em que a desmielinização é crônica ou recorrente, já que outros fatores - ausência de fatores estimuladores ou a cicatriz glial, ou mesmo fatores inibidores - interferem com essa tarefa. Devemos concluir que nos casos em que a desmielinização não é auto-limitante, e fatores genéticos, imuno-inflamatórios, e, talvez alguns ainda desconhecidos, a presença de células maduras com reserva funcional ou jovens em diferenciação, não é motivo suficiente para o sucesso da reparação tecidual.

Levine & Reynolds (1999) encontraram resposta de precursores endógenos de oligodendrócitos rapidamente após a desmielinização induzida por brometo de etídio em ratos Sprague-Dawley, em números que consideram suficientes para remielinizar os axônios desmielinizados. Eis, portanto, outra fonte para a reparação das lesões.

Tem sido descrito que a combinação de fatores na proliferação e diferenciação dos precursores oligodendrogliais é complexa e dentro de um tecido de grande complexidade (Franklin, 2002). Os modelos de desmielinização experimental como o do BE, que têm sido de grande ajuda nos esclarecimentos pontuais, têm falhado na mimetização da situação multifatorial que ocorre na esclerose múltipla. Somente os modelos que incluem uma reação imunomediada dentro do tecido se aproximam mais da verdadeira patogenia da doença. Contudo, observar que nos animais imunossuprimidos o processo de desmielinização/remielinização muda (Bondan et al., 1998b, 2000), inspira à realização de mais pesquisas no sentido de elucidar quais os fatores que tornam inadequada ou insuficiente a remielinização e conseqüentemente definem o desfecho dessa doença.

As drogas imunossupressoras que visam inibir a reação imune-inflamatória das doenças espontâneas devem ser usadas com cautela (Bondan et al., 2000), já que algumas não interferem no processo de remielinização e outras francamente o retardam (Bondan et al., 2000; Smith & Franklin, 2001; Bondan et al., 2004). As drogas usadas

neste estudo foram importantes para mostrar que, se bem inibem a resposta imune-inflamatória, podem ser deletérias à reparação do tecido nervoso.

É aconselhada, sim, a administração de terapia imunomoduladora precocemente nas doenças desmielinizantes espontâneas, principalmente nas formas progressivas dessas doenças para evitar o dano axonal que, em definitivo, dita o grau de incapacidade clínica permanente dos doentes (Kieseier & Hartung, 2003).

6. CONCLUSÕES

1. A hipertrofia astrocitária detectada nas lesões desmielinizantes induzidas pelo brometo de etídio em ratos Wistar normais e imunossuprimidos com ciclofosfamida obedece a um padrão regular de gliose isomórfica.

2. A hipertrofia astrocitária envolve os processos e não o corpo celular.

3. Oligodendrócitos maduros remielinizam axônios após desmielinização com brometo de etídio em ratos normais e imunossuprimidos com ciclosporina A.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, G. Prolonged glicocorticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white matter regions of the brain. *Glia*, v. 31 p. 219-231, 2000.

ALTHAUS, H.H. et al. Myelin basic protein induces cell death of mature pig oligodendrocytes in vitro and produces demyelination in vivo. *Neuroscience Letters*, v. 283, n. 1, p. 77-80, 2000.

BARRES, B.A. & RAFF, M.C. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*, v. 361, p. 258-260, 1993.

BARRES, B.A. & RAFF, M.C. Axonal control of oligodendrocyte development. *The Journal of Cell Biology*, v. 147, n. 6, p. 1123-1128, 1999.

BENVENISTE, E.N. & MERRIL, J.E. Stimulation of oligodendroglial proliferation and maturation by interleukin-2. *Nature*, v. 321, p. 610-613, 1986.

BENVENISTE, E.N. Cytokines: influence on glial cell gene expression and function. In: BLALOCK, J.E. (ed.) **Neuroimmunoendocrinology** 2^a ed. Basel, Karger, 1992, p.106-53.

BIGNAMI, A. & DAHL, D. **Glial cells in the central nervous system and their reaction to injury**. Austin: Landes. 1994, 109 p.

BLAKEMORE, W.F. Ethidium bromide induced demyelination in the spinal cord of the cat. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 4 p. 47-59, 1982a.

BLAKEMORE, W.F. Myelination, demyelination and remyelination in the CNS. In: CAVANAGH J.B. & SMITH W.T. **Recent advances in neuropathology**. Edinburgh, Churchill Livingstone. p. 53-81, 1982b.

BLAKEMORE, W.F.; CRANG, A.J.; EVANS R.J. The effect of chemical injury on oligodendrocytes. In: MIMS, C.A., CUZNER, M.L., KELLY, R.E. ed. **Viruses and demyelinating diseases**, 1983, London: Academic Press, cap. 16, 1983, p. 167-190.

BONDAN, E.F. Estudo morfológico do processo de remielinização no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos experimentalmente ao modelo gliotóxico do brometo de etídio e tratados com ciclofosfamida ou ciclosporina. 1997. 189 p. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997

BONDAN, E.F.; LALLO, M.A.; GRAÇA, D.L. Desmielinização experimental por Brometo de etídio no sistema nervoso central. *Revista Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 5, p. 19-32, 1998a .

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*, v. 4, p. 1-46, 1998b.

BONDAN, E.F. et al. Schwann cells may express an oligodendrocyte-like remyelinating pattern following ethidium bromide injection in the rat brainstem. *Acta Microscopica*, v. 8, Supl. C, p. 707-708,1999.

BONDAN, E.F. et al. The effect of cyclophosphamide on brainstem remyelination following local ethidium bromide injection in Wistar rats. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 32, n. 4, p. 603-612, 2000.

BONDAN, E.F. et al. Estudo da imunorreatividade astrocitária para GFAP e vimentina no tronco encefálico de ratos Wistar submetidos ao modelo gliotóxico do brometo de etídio. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 61, n. 3-A, p. 642-649, 2003.

BONDAN, E.F. et al. Estudo ultra-estrutural do processo remielinizante pós-injeção de brometo de etídio no tronco encefálico de ratos imunossuprimidos com dexametasona. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 62, n. 1, p. 131-138, 2004.

BOTTERON, C. et al. Canine distemper virus-immune complexes induce bystander degeneration of oligodendrocytes. *Acta Neuropathologica*, v. 83, p. 402-407, 1992.

BRONSTEIN, J. M. et al. A humoral response to oligodendrocyte-specific protein in MS. *Neurology*, v. 53, p. 154-161, 1999.

BRONSTEIN, J.M. et al. Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *Journal of Neuroscience Research*, v. 59, p. 706-711, 2000.

BUNGE, M.B.; BUNGE, R.P.; RIS, H. Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, v. 10, p. 67-94, 1961.

BUNGE, R.P.; BUNGE, M.B.; COCHRAN, M. Some factors influencing the proliferation and differentiation of myelin-forming cells. *Neurology*, v. 28, p. 59-67, 1978.

BUTT, A.M. et al. Cells expressing the NG2 antigen contact nodes of Ranvier in adult CNS white matter. *Glia*, v. 26, p. 84-91, 1999.

CASACCIA-BONNEFIL P. Cell death in the oligodendrocyte lineage: a molecular perspective of life/death decisions in development and disease. *Glia*, v. 29, p. 124-135, 2000.

CENCI, D.I. et al. Generation of oligodendroglial progenitors in acute inflammatory demyelinating lesions of the rat brain stem is associated with demyelination rather than inflammation. *Journal of Neurocytology*, v. 28, p. 365-381, 1999.

CHANG, A. et al. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 15, p. 288-302, 2000.

CHENG, J.D.; VELLIS, J. Oligodendrocytes as glucocorticoids target cells: functional analysis of the glycerol phosphate dehydrogenase gene. *Journal of Neuroscience Research*, v. 59, p. 436-445, 2000.

DAL CANTO, M.C.; LIPTON, H.L. Schwann cell remyelination and recurrent demyelination in the central nervous system of mice infected with attenuated Theiler's virus. *American Journal of Pathology*, v. 98, n. 1, p. 101-105, 1980.

DYER, C.A. et al. GFAP-positive and myelin-marker positive glia in normal and pathologic environments. *Journal of Neuroscience Research*, v. 60, p. 412-426, 2000.

FERNANDES, C.G.; GRAÇA, D.L.; PEREIRA, L.A.V. Desmielinização e remielinização após múltiplas injeções intramedulares de Brometo de Etídio em ratos Wistar. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 65, p. 452-459, 1997.

FERNANDES, C.G.; GRAÇA, D.L. & PEREIRA, L.A.V. Inflammatory response of the spinal cord to multiple episodes of blood-brain barrier disruption and toxic

demyelination in wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 7, p. 933-936, 1998.

FFRENCH-CONSTANT, C.; RAFF, M.C. The oligodendrocyte-type-2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination. *Nature*, v. 323, p. 335-338, 1986.

FISH, C.J.; BLAKEMORE, W.F. A model of chronic spinal cord compression in the cat. *Neuropathology. Applied Neurobiology*, v. 9, p. 109-120, 1983.

FRANKLIN, R.J.M.; BLAKEMORE, W.F. Migration of Schwann cells. Requirements for Schwann cell migration within CNS environments: a viewpoint. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 11, n. 5, p. 641-649, 1993.

FRANKLIN, R.J.M. Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nature Reviews Neuroscience*, v. 3, p. 705-714, 2002.

FROST, E.E. et al. Integrins mediate a neuronal survival signal for oligodendrocytes. *Current Biology*, v. 9, n. 21, p. 1251-1254, 1999.

FROST, E.E.; MILNER, R. & FFRENCH-CONSTANT C. Migration assays for oligodendrocyte precursor cells. *Methods in Molecular Biology*, v. 139, p. 265-278, 2000.

FUSHIMI, S.; SHIRABE, T. Expression of insulin-like growth factors in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. *Neuropathology*, v. 24, p. 208-218, 2004.

FUSHIMI, S.; SHIRABE, T. The reaction of glial progenitor cells in remyelination following ethidium bromide-induced demyelination in the mouse spinal cord. *Neuropathology*, v. 22, p. 233-242, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Color Text Book of Histology**. Philadelphia: Saunders. 1997, 483 p.

GHATAK, N.R. et al. Remyelination in the human central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 48, p. 507-518, 1989.

GRAÇA, D.L. Investigation into ethidium bromide induced demyelination in the central nervous system. 1986. Tese (PhD em Neuropatologia Experimental) University of Cambridge, UK, 131 p.

GRAÇA, D.L.; BLAKEMORE, W.F. Delayed remyelination in rat spinal cord following ethidium bromide injection. *Neuropathology Applied Neurobiology*, v. 12, p. 593-605, 1986.

GRAÇA, D.L. Mielinização, desmielinização e remielinização no sistema nervoso central. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 46, p. 292-297, 1988a.

GRAÇA, D.L. The presence of lymphocytes in a toxically-induced demyelinating process of the central nervous system. *Microscopía Electrónica y Biología Celular*, v. 12, p. 17-22, 1988b.

GRAÇA, D.L. Desmielinização tóxica do sistema nervoso central: I. Ação de uma droga intercalante gliotóxica na medula espinhal de ratos Wistar. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 47, 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. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 47, p. 268-273, 1989b.

GRAÇA, D.L.; PEREIRA, L.A.V.D. Dinâmica da impregnação celular pelo brometo de etídio in vitro e in vivo. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 42., 1990, Porto Alegre-RS. **Anais.....** Porto Alegre, SBPC, 1990. . p. 430-431.

GRAÇA, D.L. et al. Behaviour of oligodendrocytes and schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 59, n. B-2, p. 358-361, 2001.

GRINSPAN, J.B. et al. Stage-specific effects of bone morphogenetic proteins on the oligodendrocytes lineage. *Journal of Neurobiology*, v. 43, p. 1-17, 2000

HARRISON, B..M.; McDONALD, W.I.; OCHOA, J. Remyelination in the central diphtheria toxin lesion. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 17, p. 293-302, 1972.

HAUW, J. J. et al. Morphology of demyelination in the human central nervous system. *Journal of Neuroimmunology*. v. 40, p. 139-152, 1992.

HEADLEY A.S.; SOARES I.C. & GRAÇA D.L. GFAP in astrocytes of dogs infected with canine distemper vírus. *Journal of Comparativy Pathology*, v. 125, p. 90-97, 2001.

HEMMER, B. et al. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Current Opinion in Neurology*, v. 15, p. 227-231, 2002.

HIRANO, A.; LEVINE, S.; ZIMMERMAN, H.M. Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 26, p. 200-213, 1967.

ITOYAMA, Y. et al. Schwann cell remyelination of demyelinated axons in spinal cord multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, v. 14, p. 339-346, 1983.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427 p.

KEIRSTEAD, H.S.; BLAKEMORE, W. F. The role of oligodendrocytes and oligodendrocyte progenitors in CNS remyelination. In: MATSAS, A.; TSACOPOULUS, B. Eds. **The functional roles of glial cells in health and disease**. New York: Kluwer/Plenum, 1999. cap. 15, p. 183-197.

KELLY, W.R. et al. Demyelination induced in mice by avirulent semliki forest virus. II. An ultrastructural study of focal demyelination in the brain. *Neuropathology Applied Neurobiology*, v. 8, p. 43-53, 1982.

KIESEIER, B.C.; HARTUNG, H-P. Multiple paradigm shifts in multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology*, v. 16, p. 247-252, 2003.

KONDO, T.; RAFF, M.C. Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science*, v. 289, p. 1754-1756, 2000.

LEVINE, J.M.; REYNOLDS, R. Activation and proliferation of endogenous oligodendrocyte precursor cells during ethidium bromide-induced demyelination. *Experimental Neurology*, v. 160, p. 333-347, 1999.

LEVINE, J.M.; REYNOLDS, R.; FAWCETT, J.W. The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neuroscience*, v. 24, n. 1, p. 39-47, 2001.

LI, Y.; FIELD, P.M.; RAISMAN, G. Death of oligodendrocytes and microglial phagocytosis of myelin precede immigration of Schwann cells into the spinal cord. *Journal of Neurocytology*, v. 28, n. 4-5, p. 417-427, 1999.

LUDWIN, S.K. The perineuronal satellite oligodendrocyte – a possible role in myelination. *Acta Neuropathologica*, v. 47, p. 49-52, 1979.

LUDWIN, S.K.; BAKKER, D.A. Can oligodendrocytes attached to myelin proliferate? *Journal of Neuroscience*, v. 8, n. 4, p. 1239-1244, 1988.

MASON, J.L. et al. Mature oligodendrocyte apoptosis precedes IGF-1 production and oligodendrocyte progenitor accumulation and differentiation during demyelination/remyelination. *Journal of Neuroscience Research*, v. 61, p. 251-262, 2000.

MICHAEL, D.; NOREMBERG, M.D. Astrocyte Responses to CNS Injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 53, n. 3, p. 213-220, 1994.

MONTGOMERY, D.L. Astrocytes: form, functions and roles in diseases. *Veterinary Pathology*, v. 31, p. 145-167, 1994.

NAIT-OUMESMAR, B. et al. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *European Journal of Neuroscience*, v. 11, n. 12, p. 4357-4366, 1999.

NAIT-OUMESMAR, B. et al. Do central nervous system axons remyelinate? *Pathologie Biologie*, v. 48, p. 70-79, 2000.

NISHIYAMA, A.; CHANG, A. & TRAPP, B.D. NG2+ glial cells: a novel glial cell population in the adult brain. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 58, n. 11, p. 1113-1124, 1999.

NOBLE, M. et al. Development, regeneration and neoplasia of glial cells in the central nervous system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 633, p. 35-47, 1991.

NOBLE, M. et al. Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type 2 astrocyte progenitor cell. *Nature*, v. 333, p. 560-562, 1988.

OWENS, T. The enigma of multiple sclerosis: inflammation and neurodegeneration cause heterogeneous dysfunction and damage. *Current Opinion in Neurology*, v. 16, p. 259-265, 2003.

PEIREIRA, L.A.V. et al. Biology of the repair of central nervous system demyelinated lesions. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, v. 54, p. 331-334, 1996.

PEREIRA, L.A.V. et al. Dynamics of remyelination in the brain of adult rats after exposure to ethidium bromide. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, v. 30, n. 3, p. 341-348, 1998.

PETERS, A.; PALAY, S.L. & WEBSTER, H.F. **The fine structure of the nervous system**. 3 ed. New York: Oxford University Press, 1991. 494 p.

RAFF, M.C. Glial cell diversification in the rat optic nerve. *Science*, v. 243, p. 1450-1455, 1989.

RAFF, M.C.; MILLER, R.H.; NOBLE, M. A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, v. 303, p. 390- 395, 1983.

RAINE, C.S. Morphology of myelin and myelination. In: MORELL P. **Myelin**. 2 ed, 1984. New York, Plenum. p.1-50.

RAINE, C.S. Multiple sclerosis: immunopathologic mechanisms in the progression and resolution of inflammatory demyelination. In: WAKSMAN, B.H. **Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease**. 1990, New York, Raven. p. 37-54.

RAINE, C.S.; WISNIEWSKI, H. & PRINEAS, J. An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. II. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system. *Laboratory of Investigation*, 21(4):316-327, 1969.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Pharmacology**. 3^a ed. 1995, New York: Churchill Livingstone. 855 p.

RANSOM, B.; BEHAR, T.; NEDERGAARD, M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neuroscience*, v. 26, n. 10, p. 520-522, 2003.

REZENDE, P.M.; ARRUDA, W.O. Imunopatologia da esclerose múltipla. *Revista Brasileira de Neurologia*, v. 34, n. 3, p. 97-103, 1998.

RIET-CORREA, G. et al. Ethidium bromide-induced demyelination of the sciatic nerve of adult wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 35, p. 99-104, 2002.

ROGISTER, B. et al. From neural stem cells to myelinating oligodendrocytes. *Molecular and Cellular Neuroscience*, v. 14, p. 287-300

SCHOBESBERGER, M. et al Demyelination precedes oligodendrocyte loss in canine distemper virus-induced encephalitis. *Acta Neuropathologica*, v. 103, n. 1, p. 11-9, 2002.

SCHOBESBERGER, M. et al. Oligodendroglial degeneration in distemper: apoptosis or necrosis? *Acta Neuropathologica*, v. 97, n. 30, p. 279-87, 1999.

SELDIN, M.F.; STEINBERG, A. D. Immunoregulatory agents. In: GALLI, J. I.; Goldstein, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 1988, New York: Raven. p.911-934.

SHI, J.; MARINOVICH, A.; BARRES, B. A. Purification and characterization of adult oligodendrocyte precursor cells from the rat optic nerve. *Journal of Neuroscience*, v. 18, n. 12, p. 4627-4636, 1998.

SHIELDS, S. A. et al. Remyelination occurs as extensively but more slowly in old rats compared to young rats following gliotoxin-induced CNS demyelination. *Glia*, v. 28, p. 77-83, 1999.

SIMS, T.J. et al. Dorsal-ventral differences in the glia limitans of the spinal cord: an ultrastructural study in developing normal and irradiated rats. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, v. 44, p. 415-429, 1985.

SMITH, K.J.; BOSTOCK, H.; HALL, S.M. Saltatory conduction precedes remyelination in axons demyelinated with lysophosphatidyl choline. *Journal of Neurological Sciences*, v. 54, p. 13-31, 1982.

SMITH, P.M.; FRANKLIN, R.J.M. The effect of immunosuppressive protocols on spontaneous CNS remyelination following toxin-induced demyelination. *Journal of Neuroimmunology*, v. 119, p. 261-268, 2001.

STANGEL, M.; HARTUNG, A.P. Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*, v. 68, p. 361-376, 2002.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; DE LAHUNTA, A. Principles of neuropathology. In: **Veterinary Neuropathology**. Baltimore: Mosby, 1995, 527p., p. 10-30.

THOMAS, J.L. et al. Spatiotemporal development of oligodendrocytes in the embryonic brain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 59, p. 471-476, 2000.

THOMAS, W.E. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Research Reviews*, v. 17, n. 1, p. 61-74, 1992.

TIWARI-WOODRUFF, S.K. et al. OSP/Claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and $\beta 1$ integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *The Journal of Cell Biology*, v. 153, n. 2, p. 295-305, 2001

TRAPP, B.D. et al. Differentiation and death of premyelinating oligodendrocytes in developing rodent brain. *The Journal of Cell Biology*, v. 137, p. 459-468, 1997.

VAN DER GOES, A.; DIJKSTRA, C.D. models of demyelination. In: LÓPEZ, B.C.; SAMPEDRO, M. N. **Glial Cell Function**. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap. 13, p. 149-153

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. *Acta Neuropathologica*, v. 109, n. 1, p. 56-68, 2005.

WINDREM, M.S. et al. Progenitor cells derived from the adult human subcortical white matter disperse and differentiate as oligodendrocytes within demyelinated lesions of the rat brain. *Journal of Neuroscience Research*, v. 69, p. 966-975, 2002.

WOODRUFF, R.H.; FRANKLIN, R.J.M. Demyelination and remyelination of the caudal cerebellar peduncle of adult rats following stereotaxic injections of

lysolecithin, ethidium bromide, and complement/anti-galactocerebroside: A comparative study. *Glia*, v. 25, p. 216-228, 1999.

YAJIMA, K.; SUZUKI, K. Demyelination and remyelination in the rat central nervous system following ethidium bromide injection. *Laboratory Investigation*, v. 41, p. 385-392, 1979.

ANEXO A – Matriz de dados de áreas marcadas por GFAP nos grupos: controle, brometo de etídio e brometo de etídio mais ciclofosfamida

ANEXO B – Certificados de submissão de artigos