

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**O MODELO DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE  
ETÍDIO (BE): ESTUDOS MORFOLÓGICOS EM  
CAMUNDONGOS C57BL/6 NORMAIS E KNOCKOUT  
PARA CONEXINA 32**

**TESE DE DOUTORADO**

**Adriano Tony Ramos**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**O modelo desmielinizante do brometo de etídio (BE): estudos morfológicos em camundongos C57BL/6 normais e knockout para conexina 32**

**por**

**Adriano Tony Ramos**

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 a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dominguita Lühers Graça**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**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

**O MODELO DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO (BE):  
ESTUDOS MORFOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6  
NORMAIS E KNOCKOUT PARA CONEXINA 32**

elaborada por  
**Adriano Tony Ramos**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Dominguita Lühers Graça, PhD**  
(Presidente/ Orientadora)

**Cristina Gevehr Fernandes, Dra (UFPel)**

**Paulo Cesar Maiorka, Dr (USP)**

**Maria Rosa Chitolina Schettinger, Dra (UFSM)**

**Vera Maria Morch, Dra (UFSM)**

Santa Maria, 14 de dezembro de 2007.

Ramos, Adriano Tony

R175m

O modelo desmielinizante do brometo de etídio (BE) : estudos morfológicos em camundongos C57BL/6 normais e knockout para conexina 32 / por Adriano Tony Ramos ; orientador Dominguita Lühers Graça. – Santa Maria, 2007  
151 f. ; il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2007.

1. Medicina veterinária 2. Brometo de etídio 3. Desmielinização 4. Conexina32 5. Knockout 6. Histoquímica 7. Imunoistoquímica 8. Neuropatologia experimental I. Graça, Dominguita Lühers, orient. II. Título

CDU: 619

Ficha catalográfica elaborada por  
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

---

© 2007

Todos os direitos autorais reservados a Adriano Tony Ramos. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Dr. Cruz Machado, 09, União da Vitória, PR, 84600-000

Fone (0xx)42 3522-1140; End. Eletr: [adrianotony@yahoo.com.br](mailto:adrianotony@yahoo.com.br)

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por ter colocado em minha existência pessoas iluminadas que tornaram todos os dias melhores.

A meus pais, Alaor e Maria Lucia pelo apoio incondicional e incentivo em todos os momentos e principalmente, desde o primeiro minuto do inicio deste projeto. A meus irmãos Anderson e Alexsandro pelo incentivo, que mesmo distantes sempre estavam dispostos a ajudar. Aos meus familiares, que sempre apoiaram as minhas decisões. A Maria (Nega) que sempre me incentivou a nunca desistir e que muito contribuiu para a construção do meu caráter. A minha noiva, Clarissa, muito obrigado pelo incentivo, paciência e amor em todos esses anos de convívio.

A Professora Lenir, que juntamente com o prof Fernando Karan, me ajudou a dar o primeiro passo no mundo da patologia. Aos amigos e professores do LRD, Mauro, Nico, João, Zuleica, Ana Lúcia, Simone pelo apoio no inicio dessa fase aqui em Santa Maria e colaboração neste trabalho. A Professora Cristina, pela amizade e confiança depositada desde o primeiro minuto.

Aos colegas do LPV, Marione, Andréia, Marciane, Aline, Daniel, Felipe, Fabiano, Fighera, Tati, Marcia, Juliana, Deise, pela amizade e colaboração em vários momentos, especialmente aos meus amigos, Aline, Eduardo, Tessie, Fernando, Kalan, Andréia, Adriane, Maria Elisa, Bruno, Charles, Rafael, pela imensa ajuda e dedicação empenhadas neste trabalho, além da grande amizade e convivência nesse período. A profa Glaucia pela paciência, amizade e auxilio em todos os momentos de dúvida. Aos professores Claudio Barros e Luis Francisco pelos ensinamentos transmitidos.

A professora Dominguita, uma grande matriarca do mundo científico, pela incansável dedicação, paciência e ensinamentos empregados na confecção desse trabalho. Agradeço pelo convívio, carinho e amizade, que incentivaram o meu trabalho.

Ao prof Paulo, meu co-orientador, pelo grande auxilio neste trabalho, pela amizade, paciência e confiança.

A todos que colaboraram para realização desse trabalho, muito obrigado.

## **RESUMO**

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

### **O MODELO DESMIELINIZANTE DO BROMETO DE ETÍDIO (BE): ESTUDOS MORFOLÓGICOS EM CAMUNDONGOS C57BL/6 NORMAIS E KNOCKOUT PARA CONEXINA 32**

AUTOR: ADRIANO TONY RAMOS  
ORIENTADORA: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA  
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 14 de dezembro de 2007.

São descritas as alterações de microscopia de luz e ultra-estruturais induzidas pelo brometo de etídio no sistema nervoso central e periférico de camundongos KO para conexina 32. O genótipo KO foi testado por PCR e confirmado por imunofluorescência negativa para conexina 32. Os animais dos experimentos foram camundongos C57BL-6 normais (controles) e KO para conexina 32. Todos os camundongos foram mantidos em gaiolas de 5 indivíduos em sala climatizada e receberam ração e água à vontade. Uma única injeção de BE 0,1% em salina 0,9% ou de salina 0,9% (5 µl na cisterna basal e 1µl no nervo ciático) foi realizada como descrita em ratos Wistar. Os camundongos eram observados diariamente até ser realizada a eutanásia às 24 e 48 h, 3, 7, 15, 21 e 30 dias após a injeção. Os camundongos foram perfundidos através do coração; um grupo com glutaraldeído 2,5% visando o processamento para microscopia eletrônica; um outro grupo com solução salina com EDTA e posterior fixação em metacarn para inclusão em parafina. As amostras incluídas em parafina foram analisadas através dos métodos de hematoxilina e eosina, luxol fast blue e azul de toluidina. Foram realizadas imunohistoquímica e imunofluorescência visando a marcação de GFAP, CNPase, OSP, S100, e Cx43 e Cx32, respectivamente. As lesões do SNC eram discretas e tiveram uma fase ativa com desaparecimento das células gliais; os debris celulares e de mielina foram retirados por um reduzido número de fagócitos. Nos camundongos KO foram vistos granulócitos em estreito contato com bainhas de mielina em degradação. A remielinização dos axônios desmielinizados foi realizada exclusivamente por oligodendrócitos nos camundongos KO; nos camundongos normais, ocasionais células de Schwann podiam ser encontradas remielinizando axônios do SNC. No nervo ciático, as células de Schwann intoxicadas rejeitaram seus internodos de mielina; após sete dias, finas bainhas reparadas eram encontradas, com compactação irregular da mielina e alças redundantes (tomacula). Mastócitos, desgranulados ou não, eram vistos nas lesões do BE e após a injeção de solução salina. Conclui-se que o reparo das lesões do SNC difere do observado em ratos normais e imunossuprimidos devido à ausência de remielinização por células de Schwann; a falta de expressão da Cx 32 e o tamanho reduzido das lesões podem ter contribuído para essa ausência. A regeneração das bainhas perdidas no SNP obedeceu ao padrão descrito para esse modelo em outras espécies. Sugere-se que a ausência da Cx 32 não afetou o reparo do SNP devido à idade precoce dos animais.

Palavras-Chave: brometo de etídio, desmielinização, remielinização, conexina32, knockout, histoquímica, imunohistoquímica, neuropatologia experimental.

## **ABSTRACT**

DS THESIS

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

### **ETHIDIUM BROMIDE (EB) DEMYELINATING MODEL: MORPHOLOGIC STUDIES IN C57BL/6 NORMAL AND CX 32 KNOCKOUT MICE**

AUTHOR: ADRIANO TONY RAMOS

ADVISER: DOMINGUITA LÜHERS GRAÇA

Santa Maria, December 14th, 2007.

Light and ultrastructural changes of central and peripheral nervous system lesions in mice KO for connexin-32 and submitted to the ethidium bromide gliotoxic demyelinating model are described. Their KO condition was tested with PCR and a negative connexin-32 labelling was performed by immunofluorescence. The experimental animals were C57BL/6 normal mice and C57BL/6 KO for connexin-32. For all groups the animals were maintained in cages of 5 individuals within a temperature controlled room and had ration and filtered water ad libitum. A single local injection of either 0,1% ethidium bromide in normal saline (5 µl in the brainstem and 1 µl in the sciatic nerve) or normal saline was performed as described for Wistar rats. The injected mice were observed daily until euthanasia was performed at 24, 48 hours and 3, 7, 15, 21 and 30 days after injection. The mice were perfused through the heart with either neutral 10% formalin or 2,5% glutaraldehyde. Histochemical, immunohistochemical, immunofluorescence and transmission electron microscopic methods were used to analyze the development of the lesions after differentiated processing. Hematoxylin- eosine, luxol fast blue and toluidine blue methods and immunolabelling with anti-GFAP, anti-CNPase, anti-S100 protein and anti-OSP, anti Cx32 and anti Cx43 antibodies were used. Within the CNS the lesions showed an acute degenerative phase with disappearance of glial cells, and myelin sheaths were withdrawn by a scant number of macrophages. In KO mice some granulocytes were detected within the lesions in tight contact with decaying myelin sheaths. Remyelination was carried out by oligodendrocytes since no Schwann cells were seen during the regenerating process of KO mice. Occasional remyelinating Schwann cells were seen in normal mice. For the sciatic nerves, Schwann cells initially showed signs of intoxication and rejected their sheaths; after seven days, some thin newly formed myelin sheaths with uneven compaction and redundant loops (tomacula) were conspicuous. Mast cells degranulated or not were seen in all BE- induced lesions and after saline injection. It is concluded that the repair of the CNS demyelinated lesions differs from the observed in normal and immunosuppressed rats because Schwann cells remyelination was absent; the absence of connexin-32 may have caused that absence. The regeneration of lost myelin sheaths within the PNS followed the pattern already reported for this model in other species. It is suggested that the absence of connexin-32 determined the different repair of the myelin sheaths within the CNS whereas for the PNS, the normal pattern of tissue response might be due to the early age of the injected mice.

Key Words: ethidium bromide, demyelination, remyelination, connexin 32, knockout, histochemistry, imunohistochemistry, experimental neuropathology.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das conexinas nas células do sistema nervoso e a doença ou anomalia causada na presença de mutações.....	66
Tabela 2 - Distribuição do número de animais em cada grupo experimental e a relação dos tempos de eutanásia após injeção. BE: brometo de etídio e SS: solução salina.....	68
Tabela 3 - Especificações das quantidades e produtos que foram utilizados para a formulação do <i>mix</i> a ser utilizado na reação de PCR. ....	73
Tabela 4 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR. ....	73
Tabela 5 – Quantificação das lesões encontradas nos encéfalos de acordo com as lâminas analisadas.....	79
Tabela 6 - Quantificação das lesões encontradas nos nervos ciáticos de acordo com as lâminas analisadas.....	82
Tabela 7 - Quantificação das lesões ultra-estruturais encontradas nos encéfalos de acordo com as amostras analisadas. ....	87
Tabela 8 - Quantificação das lesões ultra-estruturais encontradas nos nervos ciáticos de acordo com as amostras analisadas. ....	89



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema ilustrativo das fases de diferenciação das células bipotenciais O2A até oligodendrócito e astrócito tipo II e suas respectivas imunomarcações. Fonte: (BEHAR, 2001)..... 28
- Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando bainhas de mielina com espessura proporcional ao diâmetro do axônio. n: núcleo de micróglia. db: *dense bodies*. Aumento: 10750X. Fonte: (GRAÇA, 1986). ..... 38
- Figura 3 - Diminuição do espaço extracelular, com a retirada da MAG e a compactação da mielina com a presença da P<sub>0</sub>. Fonte: (TRAPP et al., 2004). ..... 41
- Figura 4 - Esquema da periodicidade da compactação da mielina. A mielina compacta pode ser vista como um processo celular (A). Os processos crescem espiralmente (B) ao redor do axônio, e durante a compactação da mielina (C), o citoplasma (verde) é excluído. Os folhetos da membrana citoplasmática (verde escuro) fusionam para formar as linhas densas principais (D, MDL), enquanto os folhetos extracelulares (vermelho) das lamelas adjacentes se aproximam para formar as linhas intraperiódicas (D, IPL). A orientação de três proteínas que tem papel dominante na integridade da mielina compacta estão representadas. Fonte: (TRAPP & KIDD, 2004)..... 43
- Figura 5 - Esquema ilustrativo de um axônio no SNP onde o internodo é recoberto por microvilos das células de Schwann, que se entrelaçam com os microvilos da célula adjacente. Fonte: (TRAPP et al., 2004). ..... 45
- Figura 6 - Gráficos demonstrando as alterações fisio-patológicas que ocorrem no SNC e SNP durante o os processo de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio em ratos Wistar. Legenda: BE: ação do BE. M-OL: morte de oligodendrócitos. M-AS: morte

de astrócitos. RM-OL: remielinização pelos oligodendrócitos. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. AS-RA: reação astrocitária. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão. Mastócitos: presença desse tipo celular na lesão..... 49

Figura 7 - Representação das bainhas de mielina no Sistema Nervoso Central (SNC), onde os oligodendrócitos realizam a mielinização e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), onde as células de Schwann (CS) fazem a mielina. A membrana glial limitante externa (GL), formada por prolongamentos astrocíticos (AS), que separa o SNC do SNP. No detalhe do internodo do SNC mostrando as conexinas (Cx:≡) entre o axônio (Ax) e o astrócito perinodal (AP). No detalhe do SNP uma bainha de mielina que possui incisuras de Schmidt-Lantermann (ISL), onde estão presentes conexinas (Cx:≡) na membrana celular interrompendo os espaços extracelulares (EC) e a mielina compacta (MC) (detalhe menor). Possui também microvilos (Mv) e uma lamina basal (LB) como revestimento. O limite entre os dois sistemas é o astrócito perinodal (AP), que também possui junções comunicantes (Cx:≡) com o axônio. (Adaptado de: (GRAÇA, 1986)) ..... 53

Figura 8 - Esquema demonstrando uma junção comunicante entre duas células: os canais unem dois espaços intracelulares (IC) através de duas membranas (MC) No detalhe 1: Conexon transpondo a MC de uma célula, formando um poro com 6 conexinas, No detalhe 2 uma conexina formada por 4 domínios transmembrana (DTM), duas alças extra citoplasmáticas (AEC), uma alça citoplasmática (AC), um domínio amino terminal (DAT) e um domínio carboxi terminal (DCT). ..... 55

Figura 9 - Esquema representando o transporte de íons, entre os astrócitos e os neurônios. Os íons são transportados através de junções comunicantes. Os íons cálcio atuam sobre os receptores para liberar glutamato no interior dos neurônios. .... 60

Figura 10 - Local da injeção nos camundongos, no encéfalo (A) caudal ao tentório do cerebelo; (B) no nervo ciático localizado com o ponto de sutura representado por um círculo preto (Adaptado de: (RIET-CORREA, 2001)). ..... 69

Figura 11 - Indicação dos cortes que foram realizados no material do SNC (A e B) e do SNP (C e D) para processamento em parafina e congelamento (A e C) e microscopia eletrônica (B e D). As linhas pretas representam os cortes realizados no material. O ponto de sutura (cabeça de seta) auxiliou na localização da injeção no ciático (seta). ..... 71

- Figura 12 - Esquema que ilustra alguns passos de extração de DNA. O fragmento da cauda é macerado com o auxílio de uma placa gelada. No tubo é mostrada a disposição do material após a centrifugação. .... 72
- Figura 13 - Amostra de gel com os genótipos dos camundongos esperados e com os controles dos genótipos e da reação. .... 74
- Figura 14 - Resultado do PCR dos animais utilizados no experimento e os controles dos genótipos e da reação e escala de DNA (\*). .... 78
- Figura 15 – Aspectos de microscopia de luz do tecido nervoso normal da ponte adjacente ao aqueduto em camundongos normais não tratados. A. H&E Obj.: 40X. B. LFB. Obj.: 40X. C. IHQ anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 20X. .... 92
- Figura 16 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos normais injetados com BE e submetidos à eutanásia 15 dias pós-injeção. A. H&E: distribuição irregular das células no tecido. Obj.: 40X. B. LFB: coloração pálida da mielina na área de lesão (\*). Obj.: 40X. C. IHQ: marcação de processos astrocitários hipertróficos ao longo da lesão. anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. .... 93
- Figura 17 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 24 horas na ponte. Observe áreas de hemorragia no local de introdução da agulha, no cerebelo e na ponte. B. H&E: espongiose discreta no aspecto medial da ponte. Obj.: 10X. C. IHQ: marcação astrocitária para GFAP na periferia da área de espongiose. Processos oligodendrogliais estão marcados na área de espongiose; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 10X. D. LFB: escassa coloração para mielina é detectada na área de lesão onde são vistos esferóides axonais (seta). Obj.: 20X. .... 94
- Figura 18 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 48 horas na ponte. B. H&E: extensa lesão

traumática é observada no trajeto da agulha no cerebelo. Obj.: 10X. C. LFB: evidencia a lesão do cerebelo ao longo do trajeto da agulha. Obj.: 10X. D. IHQ: a marcação astrocitária acompanha o trajeto da agulha antes da área de espongioses onde há escassa marcação para CNPase; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 20X..... 95

Figura 19 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 3 dias na ponte. B. H&E: área de espongiose com balões axonais com região central hemorrágica. Obj.: 40X. C. LFB: não são observadas bainhas de mielina na região central da lesão. Obj.: 40X. D. IHQ: marcação astrocitária para GFAP na periferia da área de lesão; marcação difusa por CNPase adjacente às áreas centrais da lesão; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra-coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X..... 96

Figura 20 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 7 dias na ponte. B. H&E: moderado aumento da celularidade de localização medial e espongiose discreta. Obj.: 20X. C. LFB: área ventral direita sem coloração para mielina. Obj.: 40X. D. IHQ: marcação por GFAP nas porções dorsais da lesão e marcação residual por CNPase nas áreas mediais. anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.:40X. .... 97

Figura 21 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 15 dias na ponte. B. H&E: espongiose discreta com aumento de celularidade ventral. Obj.: 20X. C. LFB: ausência de coloração para mielina no centro da lesão. Obj.: 40X. D. IHQ: marcação de processos astrocitários hipertróficos para GFAP na periferia da lesão; ausência de marcação para CNPase na área central da lesão; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X..... 98

Figura 22 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 21 dias. B. H&E: lesão mínima na substância

branca cerebelar com discreta espongiose. Obj.: 40X. C. LFB: marcação irregular para mielina na áreas de lesão. Obj.: 40X. D. IHQ: processos astrocitários hipertróficos marcados por GFAP; processos oligodendrogliais marcados por CNPase destacam-se na áreas de lesão; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. .... 99

Figura 23 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 30 dias na ponte. B. H&E: discreta gliose medial e cavidade cística ventral. Obj.: 10X. C. LFB: finas bainhas de mielina são detectadas na área de lesão. Obj.: 10X. D. IHQ: marcação astrocitária para GFAP ao redor da cavidade cística e ao longo do trajeto da agulha; marcação de finos processos oligodendrogliais na região medial da lesão; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 10X. .... 100

Figura 24 – Aspectos de microscopia de luz de corte sagital de nervo ciático de camundongo normal. A. LFB Obj.: 40X. B. IHQ: anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. C. AT. Obj.: 40X. .... 101

Figura 25 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos normais. Ciático, lesão de 15 dias. A. LFB: bainhas de mielina fracamente coradas. Seta: nodo de Ranvier. Obj.: 40X. B. IHQ: marcação irregular de núcleos e citoplasma- setas demarcam internodo curto de mielina (remielinizado). Anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. .... 102

Figura 26 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. Ciático lesão de 24 horas. A. H&E: infiltrado inflamatório no perineuro. Obj.: 40X. B. LFB: infiltrado inflamatório no perineuro. Obj.: 40X. C. IHQ: células inflamatórias marcadas pela peroxidase no perineuro. Anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. D. AT: mastócito no endoneuro. Obj.: 40X. .... 103

Figura 27 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. Ciático lesão de 3 dias A. H&E: aumento moderado da celularidade no perineuro e discreto no endoneuro e câmaras de digestão (seta). Obj.: 20X. B. LFB: coloração irregular

das bainhas de mielina. Obj.: 20X. C. IHQ: marcação irregular preferencialmente de núcleos. Anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 20X. D. AT: mastócitos no endoneuro. Obj.: 20X..... 104

Figura 28 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. Ciático lesão de 15 dias A. H&E: aumento da celularidade no perineuro e separação das fibras no endoneuro. Obj.: 4X. B. LFB: coloração mais fraca das bainhas de mielina da região afetada (0). Obj.: 4X. C. AT: mastócitos no endoneuro e na periferia dos vasos. Obj.: 20X. D. IHQ: marcação difusa de núcleos e citoplasma. Anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X. . 105

Figura 29 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. Ciático lesão de 21 dias A. H&E: aumento da celularidade ao longo das fibras nervosas. Obj.: 20X. B. LFB: coloração de diferentes intensidades nas bainhas de mielina. Obj.: 20X. C. AT: presença de mastócitos no endoneuro e na periferia dos vasos. Obj.: 20X. D. IHQ: marcação irregular nos núcleos e citoplasma. Anti-S100 (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 20X. 106

Figura 30 - Imunofluorescência para Cx32 no pulmão e fígado de camundongos normais. A: Bronquíolo Obj.: 40X. B: trabéculas hepáticas. Obj.: 40X. Anti-Cx32 (verde; complexo estreptavidina-biotina-FITC)..... 107

Figura 31 – Imunofluorescência para Cx43 no encéfalo de camundongos KO para Cx 32. Lesão de 15 dias. A: Controle negativo. Obj.: 20X. B: marcação de astrócitos reativos na área de remielinização. Obj.: 20X. Anti-Cx43 (verde; complexo estreptavidina-biotina-FITC). . 108

Figura 32 - Imunofluorescência para OSP no encéfalo de camundongos KO para Cx32. Lesão de 7 dias. A: marcação negativa na periferia da lesão. Obj.: 20X. B: marcação positiva na mesma área. Obj.: 20X. Anti-OSP (verde; complexo estreptavidina-biotina-FITC)..... 109

Figura 33 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, no centro de lesão de 24 horas induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo normal. Expansão do espaço extracelular e visualização de algumas células intoxicadas. Obj.: 20X. B. Camundongo KO. Observa-se degeneração (d) das células gliais, expansão do espaço extracelular por desaparecimento de algumas células e axônios tumefeitos (seta). Obj.: 40X. .... 110

- Figura 34 – Ultra-estrutura, lesão de 3 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo normal. Observa-se expansão do espaço extracelular por desaparecimento das células gliais. O citoplasma de uma célula fagocitária com restos mielínicos é observado no ângulo superior esquerdo (seta). A célula endotelial (e) do vaso sangüíneo da microfotografia não está afetada. Na luz desse vaso observa-se uma célula mononuclear com escassos processos (m: monócito). B. Camundongo KO. Células gliais degeneradas (d) e bainhas de mielina vesiculadas são observadas em meio ao espaço extra-celular expandido. .... 111
- Figura 35 – Ultra-estrutura, lesão de 3 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo KO. No centro da figura observa-se um polimorfonuclear em estreito contato com bainhas de mielina não mais relacionadas com os oligodendrócitos (setas). B: maior aumento da figura A. .... 112
- Figura 36 – Ultra-estrutura, lesão de 15 dias induzida pelo brometo de etídio na ponte. A. Camundongo KO. Oligodendrócito (o) e astrócito (a) adjacentes na periferia de lesão. B. Oligodendrócito (o) na periferia da lesão. C. Oligodendrócito (o) relacionado com numerosas bainhas de mielina finas e mal compactadas na adjacência do tecido normal (parte superior da figura). .... 113
- Figura 37 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio na ponte. Lesão com 21 dias A. Camundongo normal: axônios mostram bainhas finas de mielina (remielinizadas - setas). São visualizados numerosos vasos sangüíneos (asterisco). Obj.: 40X. B: Camundongo KO: axônios mostram bainhas finas de mielina (remielinizadas - setas). Obj.: 20X. .... 114
- Figura 38 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático. Lesão com 48 horas em camundongo KO. A. Edema na região lateral direita do fascículo. Obj.: 20X. B. Aspecto aproximado onde se observa vesiculação das bainhas de mielina, presença de macrófagos (m) e polimorfonucleares (pmn) e expansão do endoneuro por edema. Obj.: 40X. .... 115
- Figura 39 – Ultra-estrutura, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático de camundongos KO. A. Lesão de 48 horas. Edema do citoplasma das células de Schwann (s) associadas a bainhas de mielina e início de vesiculação das mesmas. R: fibra de Remak. B. Lesão de 7 dias. São observadas bainhas de mielina finas e bem compactadas (setas) em meio a bainhas normais e fibras de Remak. .... 116

Figura 40 – Ultra-estrutura, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático de camundongos KO. A. Lesão de 21 dias na qual se observam axônios com bainhas de mielina fina e numerosas fibras de Remak (R). B. Lesão de 30 dias com visão aproximada das bainhas remielinizadas e as células associadas..... 117

Figura 41 – Corte semi-fino corado pelo azul de toluidina, lesão induzida pelo brometo de etídio no nervo ciático. Lesão com 30 dias em camundongo KO. A. numerosas bainhas finas (remielinizadas) com alças redundantes (*tomacula*) são observadas à direita da figura. Há alguns macrófagos (m) remanescentes no tecido. Obj.: 40X. B. Bainhas finas (remielinizadas) em cortes longitudinais são conspícuas no tecido (setas). Há um mastócito entre as fibras (cabeça de seta). Obj.: 40X..... 118



## LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA GENOTIPAGEM DE ANIMAIS KNOCKOUT DO LABORATÓRIO DE ONCOLOGIA EXPERIMENTAL - FMVZ – USP.....	141
APÊNDICE B – PROTOCOLO DE LUXOL FAST BLUE PARA MIELINA.....	144
APÊNDICE C – PROTOCOLO DE AZUL DE TOLUIDINA O, DE JONES .....	145
APÊNDICE D – PROTOCOLO DE IMUNOISTOQUÍMICA .....	146
APÊNDICE E – PROTOCOLO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	148
APÊNDICE F – FÓRMULAS DE SOLUÇÕES PARA IMUNOISTOQUÍMICA.....	149
APÊNDICE G – GRÁFICOS DEMONSTRANDO AS ALTERAÇÕES NO SNC E SNP EM CAMUNDONGOS NORMAIS E KNOCKOUT PARA CONEXINA 32.....	150

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A2B5	Anticorpo monoclonal para células O2A
AMPA	Receptor $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazolepropionato
AT	Azul de Toluidina
BE	Brometo de Etídio
CMT	Charcot-Marie-Tooth
CS	Célula de Schwann
CSPG	Sulfato de Condroitina – Proteoglicana
Cx	Conexina
CXCL1	Ligante 1 para Quimiocina
CXCR2	Receptor 2 para Quimiocina
DSPG	Sulfato de Dermatina - Proteoglicana
EAE	Encefalite Alérgica Experimental
E-NCAM	Molécula de Adesão das Células Neurais na Forma Embrionária
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
GalC	Galactocerebrosídeo
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
HSPG	Sulfato de Heparina - Proteoglicana
KDa	Kilo Dalton
KO	Knockout
KSPG	Sulfato de Queratina - Proteoglicana
LFB	Luxiol Fast B Lue
MAG	Glicoproteína Associada à Mielina
MBP	Proteína Básica da Mielina
MOG	Glicoproteína da Mielina do Oligodendrócito
NG2	Proteoglicana de Superfície Celular
NT3	Neurotropina 3
O2A	Célula Progenitora Comum para Oligodendrócito e Astrócito
O4	Anticorpo usado como marcador para Oligodendrócitos jovens
Olig1	Fator 1 de Transcrição do Oligodendrócito
Olig2	Fator 2 de Transcrição do Oligodendrócito
OPC(s)	Célula(s) Progenitora(s) de Oligodendrócito(s)
OSP	Proteína Específica do Oligodendrócito
P <sub>0</sub>	Proteína Mielínica Zero
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PDGF $\alpha$ R	Receptor Alpha para PDGF
PLP	Proteína Proteolípídica
POA	Antígeno Pancreático Oncofetal

PSA-NCAM	Molécula de Adesão das Células Neurais com Ácido Polisiálico
SN	Sistema Nervoso
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SS	Solução Salina
TGF	Fator Transformador de Crescimento
ZO	Zona Ocludente

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Ontogenia das células da Glia</b> .....	<b>27</b>
2.1.1 Diferenciação das Células de Schwann .....	28
2.1.2 Diferenciação dos Oligodendrócitos .....	31
2.1.3 Diferenciação dos Astrócitos.....	36
<b>2.2 Mielinização</b> .....	<b>37</b>
2.2.1 Mielinização pela Célula de Schwann.....	39
2.2.2 Mielinização pelo Oligodendrócito .....	43
<b>2.3 Desmielinização</b> .....	<b>44</b>
<b>2.4 Remielinização</b> .....	<b>45</b>
<b>2.5 Modelo do Brometo de Etídio (BE)</b> .....	<b>48</b>
<b>2.6 Junções Oclusivas</b> .....	<b>50</b>
2.6.1 Claudina.....	50
<b>2.7 As conexinas e a comunicação no sistema nervoso</b> .....	<b>52</b>
2.7.1 Integração Neuroglial .....	52
<b>2.8 Conexinas</b> .....	<b>53</b>
<b>2.9 Conexinas no Sistema Nervoso</b> .....	<b>55</b>
2.9.1 Conexinas em astrócitos e micróglia.....	57
2.9.2 Conexinas nos oligodendrócitos e células de Schwann .....	61
2.9.3 Patofisiologia das conexinas.....	62
2.9.4 Conclusão .....	65
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>67</b>
<b>3.1 Experimento</b> .....	<b>67</b>
3.1.1 Camundongos .....	67
3.1.2 Cirurgias .....	68
3.1.3 Perfusão .....	69
3.1.4 Processamento .....	70
<b>3.2 PCR</b> .....	<b>71</b>
<b>3.3 Histoquímica</b> .....	<b>74</b>
3.3.1 Luxol Fast Blue para mielina .....	74
3.3.2 Azul de Toluidina para mastócitos .....	75
<b>3.4 Imunoistoquímica</b> .....	<b>75</b>
<b>3.5 Imunofluorescência</b> .....	<b>76</b>
<b>3.6 Microscopia eletrônica</b> .....	<b>77</b>

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>PCR</b> .....	<b>78</b>
<b>4.2</b>	<b>Histoquímica</b> .....	<b>78</b>
4.2.1	Encéfalos .....	78
4.2.2	Nervos ciáticos .....	81
<b>4.3</b>	<b>Imunoistoquímica</b> .....	<b>84</b>
4.3.1	Encéfalos .....	84
4.3.2	Ciáticos .....	86
<b>4.4</b>	<b>Imunofluorescência</b> .....	<b>86</b>
4.4.1	Cx32 .....	86
4.4.2	Cx43 .....	86
4.4.3	OSP .....	86
<b>4.5</b>	<b>Microscopia eletrônica</b> .....	<b>87</b>
4.5.1	Encéfalos .....	87
4.5.2	Ciáticos .....	89
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>130</b>

## INTRODUÇÃO

No início dos estudos do tecido nervoso, quando se atribuiu às células da glia a função de cola dos neurônios, ‘Nervenkitt’, como foi batizada por Virchow em 1859, não se imaginava que, além de manter os neurônios unidos, a glia seria responsável pela comunicação intercelular, bem como por muitas outras funções (DERMIETZEL & SPRAY, 1998). Hoje são conhecidas as funções básicas de cada tipo celular glial.

No desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), durante a embriogênese, o primeiro passo é a formação da notocorda e do mesoderma paraxial com subsequente evolução para o tubo neural. Isto ocorre por meio da proliferação celular e da remodelação tecidual, incluindo a proliferação das células neuroepiteliais germinativas que delimitam o tubo neural, onde haverá multiplicação das células progenitoras neuronais e gliais. A organização do tecido nervoso termina com a migração das células progenitoras a partir da zona germinativa para formar as colunas da substância cinzenta da medula espinhal, vários núcleos no tronco encefálico, os núcleos e córtex do cerebelo e cérebro. O desenvolvimento completo do SNC ocorre no período pós-natal (DERMIETZEL & SPRAY, 1998).

Há vários fatores que podem influenciar a complexa maturação do SNC, gerando circuitos defeituosos entre os diversos tipos celulares, essas interações são de vital importância para o seu desenvolvimento e funcionamento corretos. As junções comunicantes constituem um componente molecular essencial na integração das funções desempenhadas pelas células no SNC, comandando os sinais intercelulares através de dois modos de transmissão em redes ou por volumes (DERMIETZEL & SPRAY, 1998; DERMIETZEL, 1998), que são transmitidos de duas maneiras, pelas junções comunicantes ou pelas sinapses, por onde passam na forma de um sinal químico (neurotransmissor) ou elétrico (íons) (NAGY et al., 2004).

O processo de mielinização realizado pelos oligodendrócitos no sistema nervoso central e pelas células de Schwann no sistema nervoso periférico é um dos mais significantes marcos na evolução dos vertebrados, pois permite a rápida transmissão nervosa através de finas fibras nervosas, e promove o desenvolvimento de um sistema nervoso compacto capaz de integrar as funções motoras, sensoriais e cognitivas dos indivíduos (TRAPP et al., 2004). Ao contrário do SNC, o SNP dos mamíferos adultos prontamente se regenera após lesão (FILBIN, 2003). As bainhas de mielina são essenciais para o funcionamento do SNP. Nas

neuropatias hereditárias onde a mielinização é defeituosa, muitas incapacidades e retardamento do desenvolvimento são vistos (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Para estudar a reação do organismo frente a episódios, únicos ou múltiplos, de desmielinização, pode-se utilizar o modelo de desmielinização tóxica do brometo de etídio. Este modelo é baseado na morte das células neurogliais, astrócitos e oligodendrócitos, secundariamente à injeção de brometo de etídio, e tem como consequência uma área de desmielinização, seguida de remielinização por oligodendrócitos e células de Schwann (FERNANDES et al., 1997).

Os objetivos desta investigação foram: estudar o modelo desmielinizante do BE em camundongos normais e KO para Cx32 no SNC (tronco encefálico) e comparar os resultados com os obtidos anteriormente em ratos normais e imunossuprimidos (ciclosoprina e ciclofosfamida); investigar o modelo desmielinizante do BE em camundongos normais e KO para Cx32 no SNP (nervo ciático) e comparar os resultados com os obtidos anteriormente em ratos normais.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Ontogenia das células da Glia

Os astrócitos e os oligodendrócitos assim como os neurônios se originam do neuroectoderma (BIGNAMI & DAHL, 1994; MILLER & REYNOLDS, 2004). A micróglia origina-se dos monócitos sanguíneos que invadem o SNC no período perinatal (BIGNAMI & DAHL, 1994).

A célula glial progenitora bipotencial pode se desenvolver em oligodendrócito ou em um tipo de astrócito na dependência de fatores específicos de cada estágio no SNC (SAWAMURA et al., 1995). As células progenitoras O2A são pequenas células mitóticas que têm processos e são identificadas pelo anticorpo monoclonal A2B5, não expressam galactocerebrosídeo (GalC) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que são marcadores para oligodendrócitos e astrócitos, respectivamente. Essas células quando cultivadas em condições livres de soro se desenvolvem em oligodendrócitos GalC+/A2B5-, porém quando expostas a soro fetal bovino se diferenciam em astrócitos tipo 2 GFAP+/A2B5+ (Figura 1) (SAWAMURA et al., 1995; MILLER & REYNOLDS, 2004).

No desenvolvimento do SNC ocorre a proliferação de células estreitamente justapostas e há diferenciação dessas células em duas populações distintas. Essas duas populações, neurônios e neurógli, desenvolvem padrões geométricos complexos. A neurógli recebeu este nome de Virchow, pois ele acreditava que estas células serviam para manter os neurônios unidos, funcionando como uma cola (**neural glue**) (BIGNAMI & DAHL, 1994). As células da neurógli podem ser divididas de acordo com o seu tamanho em dois grupos: a macróglia que inclui os oligodendrócitos, a linhagem astrocitária, as células ependimárias, as células satélites e as células de Schwann e a micróglia. Segundo a localização temos a glia central, onde estão a linhagem astrocitária, os oligodendrócitos, as células ependimárias e os microgliócitos. A glia periférica inclui as células satélites e as células de Schwann (BANKS, 1992).

A diferenciação funcional das células formadoras de mielina é governada e também dependente de um contato físico com outra célula, mais especificamente com os axônios dos neurônios. Nenhuma das duas estruturas, nem os axônios nem as células formadoras de mielina se diferenciam funcionalmente por completo sem a interação com a outra (TRAPP et al., 2004). Entretanto, a produção de membranas de mielina é iniciada independentemente do



contato neuronal. Em cultura pura de oligodendrócitos, esses produzem quantidade significativa de membrana tipo mielina, porém a quantidade e a estabilidade da mielina são intensificadas *in vivo*, provavelmente como resultado do contato extensivo com o axônio (TRAPP et al., 2004).

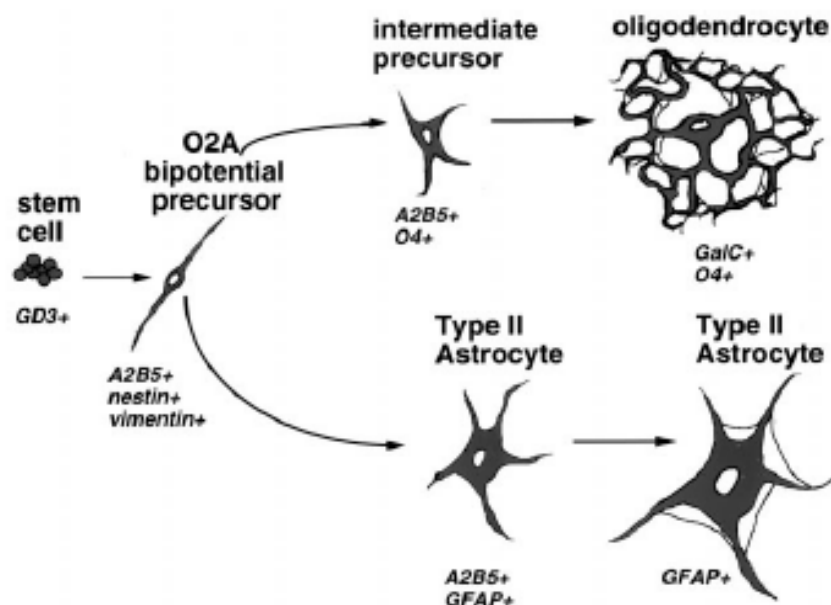


Figura 1 - Esquema ilustrativo das fases de diferenciação das células bipotenciais O2A até oligodendrócito e astrócito tipo II e suas respectivas imunomarcações. Fonte: (BEHAR, 2001).

Quando o oligodendrócito entra no processo, ou fase de diferenciação terminal e em contato com os axônios, inicia a produção de membrana de mielina em larga escala ( $>10^4 \mu\text{m}^2$  superfície/célula/dia). A marca celular biológica de diferenciação é a capacidade de produzir membranas de mielina que resulta em uma única extensão da membrana plasmática das células formadoras de mielina que se enrolam espiralmente em torno do axônio (TRAPP et al., 2004).

### 1.1.1 Diferenciação das Células de Schwann

As células de Schwann se originam na crista neural e continuam sua migração para a periferia em associação com os axônios (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997; TRAPP et al., 2004; JESSEN & MIRSKY, 2004). Até alcançar seu destino final, cada célula de Schwann envolve alguns axônios de diâmetro pequeno, formando um pacote poliaxonal. Axônios que são destinados à mielinização sofrem um processo de maturação caracterizado pelo aumento de diâmetro. Quando o axônio se torna maduro, a célula de Schwann separa este axônio do pacote poliaxonal. As células de Schwann se dividem em uma célula filha que mantém o

pacote poliaxonal, e outra que estabelece uma relação única com um axônio segregado e o mieliniza (TRAPP et al., 2004; JESSEN & MIRSKY, 2004). A mielinização pelas células de Schwann é regulada pelos axônios e a sua iniciação está relacionada à divisão celular. A divisão celular e a iniciação das células de Schwann com fenótipo mielinizador ocorrem por sinais moleculares que podem ou não ser os mesmos. Os processos de segregação axonal, divisão das células de Schwann e mielinização continuam até que todos os axônios sejam mielinizados. Os axônios de diâmetro pequeno que agem como sensores (fibras-C) são mantidos embainhados pelas células de Schwann, porém não são mielinizados (TRAPP et al., 2004).

A associação com o axônio não parece ser o único sinal para a diferenciação das células de Schwann. Foi comprovado *in vivo* e *in vitro* que a neuregulina-1 e as endotelinas 1-3 regulam a progressão da linhagem e a sobrevivência e proliferação das células de Schwann em nervos embrionários. Dois sinalizadores intracelulares são essenciais para o desenvolvimento das células de Schwann; um é o fator de transcrição Sox-10, que é necessário para o estabelecimento da linhagem das células de Schwann e o outro é o Krox-20, o qual é necessário para a mielinização. O fator de transcrição Oct-6 tem um papel importante no tempo de mielinização (JESSEN & MIRSKY, 2004).

Enquanto a célula de Schwann se diferencia e produz uma membrana basal, ela adquire polaridade com a interação do citoesqueleto com alguns componentes da membrana basal, principalmente laminina e fibronectina. A MAG também tem um papel importante na mielinização; está presente nas membranas das células de Schwann em torno das fibras mielinizadas, porém não está presente nas células associadas a fibras não mielinizadas. Provavelmente, o MAG funciona através de interações com o citoesqueleto e isso facilita os processos de extensão e rotação durante a mielinização. Uma proteína com 47 KDa, específica das células de Schwann chamada periaxina, foi descrita na região periaxonal da membrana plasmática das células de Schwann, essa proteína possivelmente interage com a MAG durante a mielinização (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Apesar da P<sub>0</sub> ser identificada como a principal proteína da mielina das células de Schwann, está claro que o gene P<sub>0</sub> é expresso desde a linhagem embrionária das células de Schwann, nas células de Schwann não maduras e nos precursores das células de Schwann. Entretanto, a expressão da P<sub>0</sub> nessas células é muito menor que a expressão e P<sub>0</sub> induzida pelo axônio nas células mielinizadoras (JESSEN & MIRSKY, 2004).

O comprimento da célula de Schwann embrionária varia de 30 a 60 µm e se torna associado ao comprimento do axônio do nervo em desenvolvimento. Quando o nervo aumenta

de comprimento, a célula de Schwann também aumenta, assim como a distância internodal, até o animal ficar adulto. A distância internodal pode atingir cerca de 190  $\mu\text{m}$  às 18 semanas de gestação e 475  $\mu\text{m}$  ao nascimento. No nervo adulto, as células de Schwann podem chegar a mais de 1 mm de comprimento em torno das fibras mielinizadas. As fibras não mielinizadas podem atingir 250  $\mu\text{m}$  de comprimento. Entretanto, após lesão onde ocorre degeneração e desmielinização segmentar, o comprimento da célula de Schwann volta para o comprimento embrionário e produz internodos curtos nas fibras nervosas em regeneração e remielinização (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

A produção de fatores de crescimento de nervos pelas células de Schwann ocorre durante o desenvolvimento e durante os processos de regeneração. As células de Schwann imaturas e em proliferação têm maior volume de citoplasma se comparadas com as células de Schwann maduras. O citoplasma da células de Schwann é rico em mitocôndrias, polirribossomos, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso. O citoesqueleto dessas células incluem filamentos intermediários de vimentina, o que parece óbvio principalmente nas fases ativas de proliferação e migração que ocorrem durante o desenvolvimento e a regeneração (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

As células de Schwann nos nervos periféricos têm dois fenótipos principais: aquelas que embainham múltiplos axônios (fibras não mielinizadas) e aquelas que mielinizam um único axônio (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997; TRAPP et al., 2004). Todas as células de Schwann têm potencial para formar mielina, elas só precisam receber a indução apropriada pelo axônio periférico. Embora a natureza molecular do sinal axonal seja pouco entendida, algumas observações indicam que ele atua na transcrição do gene das proteínas da mielina (TRAPP et al., 2004). As fibras não mielinizadas ou fibras amielínicas são conhecidas como fibras de Remak, e são fibras pequenas que podem não conter nenhuma mielina ou serem envolvidas por traços de mielina. Essas fibras estão no interior de invaginações alongadas do citoplasma da célula de Schwann e estão revestidas pela membrana citoplasmática dessas células. Esta conformação pode ser chamada de bainha de Schwann ou bainha de neurolema (BANKS, 1992).

O citoplasma das células de Schwann é dividido em dois compartimentos; o primeiro ao redor do núcleo e do lado de fora da bainha de mielina; o segundo, um fino anel de citoplasma no interior da bainha de mielina e ao redor do mesaxônio interno (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). A proteína S-100 está presente no citoplasma das células de Schwann, e pode ser identificada por marcação imunoistoquímica, porém o principal

filamento intermediário das células de Schwann é a vimentina (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

As células de Schwann de fibras amielínicas não expressam níveis detectáveis de RNA mensageiro de proteínas de mielina (TRAPP et al., 2004). As fibras amielínicas são prolongamentos curtos com baixa velocidade de condução do impulso (BANKS, 1992). As proteínas P<sub>0</sub> e MBP acumulam até os mesmos níveis dos seus respectivos RNA mensageiro e paralelamente à taxa de formação de mielina durante o desenvolvimento. A remoção dos axônios por secção ou dissociação celular resulta em rápida diminuição na expressão dos genes das proteínas da mielina (TRAPP et al., 2004).

Seguindo a secção do nervo, axônios do nervo ciático regeneram entre o coto distal das células de Schwann, estas células de Schwann re-expressam genes das proteínas de mielina e mielinizam, quer elas venham de nervos previamente mielinizados ou não mielinizados (TRAPP et al., 2004).

#### 1.1.2 Diferenciação dos Oligodendrócitos

Os oligodendrócitos são os elementos mais numerosos da glia; juntamente com os astrócitos, ambos contribuem com cerca de 40 a 50 % das células no SNC (ALDSKOGIUS & KOZLOVA, 1998). Essas células são caracterizadas pelo núcleo pequeno, oval ou arredondado, que pode variar de grande e claro a pequeno e escuro. Essa célula contém pequena quantidade de citoplasma (BANKS, 1992) e poucos prolongamentos celulares (BANKS, 1992; ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). Os oligodendrócitos podem ser perineuronais, perivasculares ou interfasciculares. Os oligodendrócitos perineuronais podem ter algum tipo de função nutridora (BANKS, 1992), e podem ser identificados, tanto na substância branca como na substância cinzenta por possuírem um halo perinuclear, dando a essas células a aparência de um ovo frito, resultado do aumento e vacuolização do citoplasma. Isso é resultante de artefato, assim como o aumento dos espaços perivasculares, decorrentes da tumefação dos pés dos astrócitos (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Durante o início do desenvolvimento provavelmente todas as células do tubo neural, as quais possuem muitas características de células-tronco, têm a capacidade de gerar oligodendrócitos, entretanto durante o curso da embriogênese somente algumas células manifestam este potencial. As primeiras células com características bem definidas da linhagem oligodendrogliol em nervo óptico de roedores expressam antígenos de superfície reconhecidos pelo anticorpo monoclonal A2B5. Muitas outras características antigênicas são atribuídas aos precursores iniciais dos oligodendrócitos, incluindo a expressão de antígeno

NG2, a forma embrionária do ácido polissialico que contém a molécula de adesão neural E-NCAM ou PSA-NCAM, e outros antígenos reconhecidos por um número de anticorpos monoclonais diferentes incluindo GD3. O maior fator de crescimento para os precursores de oligodendrócitos é o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). A expressão do receptor alfa para PDGF (PDGF $\alpha$ R) é a característica mais recente descoberta dos precursores de oligodendrócitos (MILLER & REYNOLDS, 2004).

Os precursores de oligodendrócitos sofrem várias mudanças estruturais e bioquímicas até amadurecerem. Estruturalmente, iniciam o desenvolvimento de uma morfologia mais complexa e frequentemente desenvolvem múltiplos processos citoplasmáticos, entretanto ainda há um corpo celular relativamente grande. Bioquimicamente os precursores de oligodendrócitos em maturação expressam antígenos em sua superfície que se ligam a anticorpos monoclonais para O4. Entre esses antígenos está o antígeno POA e o galactosulfatídeo que posteriormente irá se tornar um componente estrutural da mielina. As células nesse estágio de desenvolvimento são chamadas de pró-oligodendrócitos e expressam também um número de outros antígenos característicos, incluindo proteínas mielínicas dos estágios iniciais. A diferenciação dessas células em oligodendrócitos maduros está associada à perda de expressão de antígenos das células precursoras como, por exemplo, o marcado pelo mAbA2B5 e o ganho da expressão de antígenos de oligodendrócitos como o galactocerebrosídeo o principal glicolípido da mielina. A morfologia do oligodendrócito começa a tornar-se mais complexa, com múltiplos processos celulares e um corpo celular pequeno. Sob certas condições de cultura essas células começam a expressar amplas lâminas membranosas que podem representar os estágios iniciais da formação da mielina. Continuando a maturação, ocorre o aumento da expressão das principais proteínas da mielina como da proteína básica da mielina (MBP) e da proteína proteolípídica (PLP) (MILLER & REYNOLDS, 2004).

O principal indutor de mitose das células imaturas precursoras de oligodendrócitos A2B5<sup>+</sup> é o PDGF. A resposta mitogênica é mediada através do receptor alfa para o PDGF (PDGF $\alpha$ R). A expressão desse receptor sobrepõe-se à imunoreatividade da A2B5 e por esse motivo caracteriza os precursores de oligodendrócitos em regiões específicas do SNC em desenvolvimento. Os precursores de oligodendrócitos imaturos também respondem ao fator de crescimento fibroblástico (FGF), até certo grau e em menor extensão, embora a combinação de PDGF e FGF promova extensa proliferação e iniba a diferenciação. Algumas outras citocinas e fatores de crescimento influenciam a proliferação de precursores de oligodendrócitos imaturos, essas incluem neurotropina NT3, fator de crescimento tipo insulina

e a quimiocina CXCL1. Esta última, embora não sendo um mitógeno por si próprio, aumenta a resposta proliferativa de precursores de oligodendrócitos imaturos ao PDGF, e o seu sinergismo é mediado através dos receptores de quimiocina CXCR2. O desenvolvimento dos precursores dos oligodendrócitos é inibido, *in vitro*, pela exposição a membros da família TGF, mais especificamente proteína morfogênica do osso 2 e 4 (MILLER & REYNOLDS, 2004).

Apesar da maioria dos oligodendrócitos maduros estarem localizados na substância branca, as células fundadoras da linhagem oligodendrocítica provêm no início do desenvolvimento de regiões restritas do tubo neural. O local de origem dos precursores dos oligodendrócitos não é restrito à medula espinhal. Em regiões mais rostrais do SNC, os precursores dos oligodendrócitos se originam em regiões específicas da zona do manto ventricular e subventricular, em estágios específicos do desenvolvimento. As células da zona do manto ventricular do diencéfalo frontal parecem migrar através do tálamo e hipotálamo em desenvolvimento, bem como até regiões mais dorsais incluindo o cerebelo em desenvolvimento. Embora a maioria das regiões do SNC pareça ser povoada por células precursoras derivadas de uma única região, foram descritos múltiplos domínios de células precursoras de oligodendrócitos no telencéfalo, incluindo área anterior do pedúnculo e do bulbo olfatório. Entretanto, não é muito claro se a progênie de cada um desses domínios é idêntica e se eles contribuem com os oligodendrócitos para envolver ou não envolver o axônio (MILLER & REYNOLDS, 2004).

Os anticorpos para o proteoglicano sulfato de condroitina NG2 e para receptor  $\alpha$  do PDGF foram usados para identificar as OPCs no SNC em desenvolvimento e também no SNC adulto. Esses anticorpos, quando usados no encéfalo de roedores adultos, identificam uma ampla e numerosa população de células que possuem o fenótipo das células progenitoras mais maduras. Em todas as regiões do SNC adulto, incluindo a substância branca e a substância cinzenta, a expressão de NG2 sobrepõe a expressão de receptor  $\alpha$  do PDGF. A evidência mais importante de que essas células representam as OPCs é a demonstração, *in vivo*, de que elas também expressam o antígeno O4, porém não expressam antígenos específicos de células mais maduras da linhagem oligodendrocítica como CNP, galactocerebrosídeo e proteína básica da mielina. Entretanto, há alguns relatos recentes de que as OPCs no SNC adulto podem expressar baixos níveis de galactoserebrosídeo e glicoproteína da mielina do oligodendrócito (MOG). Todas essas evidências sugerem que essas células são fenotipicamente parte da linhagem oligodendrocítica e são estreitamente relacionadas aos progenitores mais maduros NG2+/ PDGF- $\alpha$ R+/O4+ encontradas durante o desenvolvimento. Essas células aparentemente

param a diferenciação em um ponto antes de se diferenciarem em oligodendrócitos jovens pós-mitóticos, isso para poderem se transformar em oligodendrócitos após desmielinização ou serem capazes de somente diferenciarem-se (MILLER & REYNOLDS, 2004).

As OPCs NG2+ e PDGF- $\alpha$ R+ são encontradas em abundância em todas as regiões da substância branca e cinzenta, e em todo SNC compreendem entre 3 a 9 % de todas as células dependendo da região. A relação do número de OPCs na substância cinzenta em relação à substância branca é de 1:1,5, isso demonstra que a densidade numérica dessas células não é simplesmente um reflexo da abundância da mielina; esse resultado reforça a teoria de que essas células também tem outros papéis no SNC, além de proverem uma população de células reserva que podem sintetizar mielina em situações fisiológicas e patológicas. O papel dessas células na remielinização é importante, e a taxa de conversão das OPCs em oligodendrócitos varia de aproximadamente 1:4 na substância branca e cinzenta da medula espinhal, mas somente 1:1 no córtex cerebral e hipocampo, isso é importante para a eficiência e a velocidade de remielinização nessas diferentes áreas (BIGNAMI & DAHL, 1994).

Sugere-se que as OPCs adultas sejam uma população de células tronco em divisão lenta no SNC de roedores adultos, capazes de gerar, em qualquer idade, células da linhagem oligodendrogliar. As OPCs podem mudar as suas propriedades durante o desenvolvimento, podem prolongar o tempo do ciclo celular, possivelmente pelo acúmulo de p27, e eventualmente atingir propriedades de OPCs adultas. A produção contínua de PDGF pelos astrócitos pode criar um sinal que mantém essas células com uma baixa taxa de proliferação. A promoção da diferenciação das OPCs adultas até a mielinização pode ser prevenida pela ativação de uma via de sinalização Notch-Jagged. O receptor Notch das OPCs pode ser ativado pelo ligante Jagged dos oligodendrócitos vizinhos ou dos nodos de Ranvier. Entretanto, foi demonstrado *in vitro* que a mielina pode inibir a diferenciação total das OPCs. O Notch também pode ter uma distribuição assimétrica após a divisão das OPCs no SNC adulto, proporcionando que as células filhas se diferenciem em oligodendrócitos e também mantendo o número de OPCs (BIGNAMI & DAHL, 1994).

Os oligodendrócitos têm como principal função produzir e manter as bainhas de mielina no SNC. A metodologia do carbonato de prata de del Rio-Hortega para oligodendrócitos demonstrou a presença dessas células também na substância cinzenta, as células satélites perineuronais. As células satélites perineuronais são encontradas mais comumente em torno de células piramidais de tamanho médio no córtex cerebral e em grandes neurônios no corpo estriado, sendo similares às células cápsula do gânglio da raiz dorsal. As células satélites não são marcadas por anticorpos como anidrase carbônica e marcadores para

oligodendrócitos no encéfalo de ratos. Na microscopia eletrônica, todas as células com características de oligodendrócitos estão conectadas a bainhas de mielina (BIGNAMI & DAHL, 1994).

Embora a produção e a manutenção da mielina seja a principal função dos oligodendrócitos, esta não é sua única função; também contribuem para a manutenção do equilíbrio ácido-base, pois a anidrase carbônica está localizada exclusivamente nos oligodendrócitos e na glia de Muller na retina. No SNC os oligodendrócitos são a única fonte de transferrina, uma proteína carreadora de ferro, que regula o movimento e o estoque desse metal (BIGNAMI & DAHL, 1994).

As OPCs são abundantes na substância branca ou cinzenta do SNC adulto e também possuem uma rede extensa de processos, essas características são evidências de que as OPCs têm outro papel além de serem progenitores de oligodendrócitos. A presença de processos de células NG2+ nos nodos de Ranvier e nas sinapses é sugestiva de que elas têm um papel de modulação na atividade neuronal. A presença de receptores AMPA nas OPCs, aliada à entrada de glutaminérgicos sinápticos nessas células e a habilidade de transportar glutamato, indicam também uma participação na homeostase e neurotransmissão do glutamato (MILLER & REYNOLDS, 2004).

Mudanças no ambiente do SNC após lesão ou perda da mielina aparentemente habilitam as OPCs adultas a rapidamente retornarem ao fenótipo mitótico das OPCs neonatais, que podem repor um grande número de oligodendrócitos. As OPCs adultas reagem a uma variedade de insultos patológicos no SNC, pelo aumento da expressão de NG2 e pelo engrossamento dos processos primários. Depois os processos são retraídos e o corpo celular se torna inchado. Quando ocorre desmielinização e processo de lesão severa, estes eventos são seguidos de proliferação. Uma característica importante de toda essa resposta, no caso do insulto levar a desmielinização, é que esta resposta é extremamente limitada e rápida, e somente as OPCs na área de desmielinização e na sua borda proliferam. Em processos inflamatórios as OPCs mostram alterações reativas mas não proliferam, isso sugere que em lesões de desmielinização onde as OPCs estão preservadas, a proliferação ocorre em parte pela combinação de sinais dos axônios expostos naquele momento com a sinalização sinérgica dos astrócitos e da micróglia/macrófago. Esse processo parece gerar um número mais que suficiente de células para realizar a remielinização (MILLER & REYNOLDS, 2004).

Após a remielinização o número de OPCs Ng2+ ou PDGF $\alpha$ R+ da área de desmielinização retornam aos níveis anteriores a lesão ou permanecem elevados. Isso pode ser esperado nesse caso, pois as OPCs atuam como uma população de células-tronco, que se



dividem assimetricamente para manter a população de células para reparos futuros. Não há alterações no número de OPCs NG2+ nas áreas em torno de lesões induzidas pelo brometo de etídio na medula espinhal de roedores (MILLER & REYNOLDS, 2004).

### 1.1.3 Diferenciação dos Astrócitos

Os astrócitos são células que possuem muitos prolongamentos e núcleo grande, arredondado ou oval, geralmente claro (BANKS, 1992). Assim como os neurônios, os astrócitos são heterogêneos (FULLER & BURGER, 1997). São divididos em dois tipos diferentes: os fibrosos ou tipo II e os protoplasmáticos ou tipo I (BANKS, 1992; FULLER & BURGER, 1997). O tipo protoplasmático tem mais citoplasma que o tipo fibroso, e possui menos marcação para a proteína glial fibrilar ácida que o último. O tipo fibroso está presente mais na substância branca e o tipo protoplasmático na substância cinzenta (FULLER & BURGER, 1997). Os astrócitos são importantes para a manutenção da estrutura do cérebro e da medula espinhal (BANKS, 1992). Outro tipo importante de astrócitos são os pilocíticos da região periventricular, do cerebelo, da medula espinhal e a glia de Bergmann que estão distribuídos em uma estreita camada entre os corpos celulares das células de Purkinje no córtex cerebelar (FULLER & BURGER, 1997). A glia limitante externa é formada pelos astrócitos. Eles revestem as superfícies receptoras nervosas atuando como isolantes e também são responsáveis pela reparação dos defeitos (BANKS, 1992) e pela formação de cicatriz no tecido nervoso do SNC (BANKS, 1992; BIGNAMI & DAHL, 1994; SILVER & MILLER, 2004). Os astrócitos podem sofrer hiperplasia, hipertrofia e realizar fagocitose (BANKS, 1992).

Em lesões onde a dura-máter não é rompida, a cicatriz é formada principalmente por astrócitos, entretanto quando ocorre o rompimento das meninges e a lesão é mais severa, a astróglia está entremeada a elementos do tecido conjuntivo invasor (SILVER & MILLER, 2004). Por esse motivo os astrócitos foram relacionados como os “fibroblastos dos SNC” (FULLER & BURGER, 1997). A resposta dos astrócitos ao dano é relatada como gliose reativa, porém realmente, na maioria dos tipos de lesões, a real quantidade de células gliais divididas é relativamente pequena e está confinada ao halo ao redor do centro da lesão. O fato mais importante da reposta glial reativa à lesão é a hipertrofia com aumento da produção de filamentos intermediários. A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é um dos principais marcadores imunocitoquímicos que pode identificar astrócitos reativos hipertrofiados, assim como a vimentina que é outro filamento intermediário protéico importante (SILVER & MILLER, 2004).

Após lesões graves ocorre uma astrogliose reativa aguda, geralmente formando uma gliose fibrilar densa; esse tipo de reação crônica pode possuir inclusões citoplasmáticas distintas chamadas de fibras de Rosenthal, que são achados de uma variedade de lesões e possuem um só significado: a cronicidade do processo (FULLER & BURGER, 1997).

Apesar de impedir a regeneração, evidências recentes indicam que a cicatriz glial pode fornecer funções benéficas muito importantes para estabilizar o fragilizado tecido do SNC após lesão. Essas funções foram confirmadas por técnicas que induziram a depleção da subpopulação de astrócitos reativos que, sofrendo mitose, envolvem o centro da lesão. Esses achados indicam que após sofrer uma lesão, os componente da cicatriz glial serve como reconstituente da barreira hemato-encefálica, impedindo uma resposta inflamatória opressiva e limitando a degeneração celular (SILVER & MILLER, 2004).

Os astrócitos produzem moléculas promotoras de crescimento e também uma classe de moléculas conhecidas como proteoglicanas. São quatro classes de proteoglicanas: sulfato de heparina (HSPG), sulfato de dermatina (DSPG), sulfato de queratina (KSPG) e sulfato de condroitina (CSPG). O CSPG forma uma ampla família, que inclui agrecanina, brevicanina, neurocanina, NG2, fosfacanina e vessicanina. A expressão dessas CSPG aumenta na cicatriz glial nos SNC de animais adultos. Muitos trabalhos demonstram que as CSPG são extremamente inibitórias ao brotamento do axônio em cultura (SILVER & MILLER, 2004). A natureza inibitória dos proteoglicanos inclui a ação como repelentes para os axônios embrionários e adultos, *in vitro* esse efeito pode agir por mais de uma semana. Em mamíferos adultos os CSPGs são secretados rapidamente após uma lesão, em torno de 24 horas, e podem persistir por vários meses. Foi demonstrado que os CSPG são produzidos em excesso pelos astrócitos quando esses estão reativos *in vivo* após pequenas lesões na zona de entrada da raiz dorsal. A astrógliose reativa do período embrionário pré-crítico não aumenta os níveis de CSPGs após a ocorrência de uma lesão (SILVER & MILLER, 2004).

## 1.2 Mielinização

A mielina foi definitivamente demonstrada como sendo uma extensão espiralada da membrana plasmática das células de Schwann no sistema nervoso periférico, e da membrana plasmática dos oligodendrócitos no sistema nervoso central (TRAPP & KIDD, 2004). Os oligodendrócitos formam múltiplos internodos de mielina, até 200, enquanto as células de Schwann formam um único internodo (GRAÇA, 1988a; TRAPP & KIDD, 2004). Os internodos de mielina mostraram ser domínios ultraestrutura e bioquimicamente distintos, que não são idênticos no sistema nervoso central e periférico (TRAPP & KIDD, 2004). A

composição lipídica é muito similar nos dois sistemas, porém a composição protéica é notadamente distinta, visto que a proteína  $P_0$  não está presente no SNC. No SNC há uma glicoproteína, solúvel em solventes orgânicos que provavelmente é homóloga a  $P_0$  dos nervos periféricos. Essas diferenças bioquímicas contribuem para as diferenças na estrutura da mielina nos dois sistemas, por exemplo, os espaços entre as linhas densas são menores no SNC (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

A bainha de mielina é uma estrutura lipoprotéica depositada ao redor de axônios, que esta dividida em internodos, cujos limites são os nodos de Ranvier. A espessura das bainhas está diretamente relacionada com o diâmetro do axônio (Figura 2) (GRAÇA, 1986). Assim ocorre a condução saltatória, rápida e eficaz no sistema nervoso dos vertebrados (GRAÇA, 1988a).

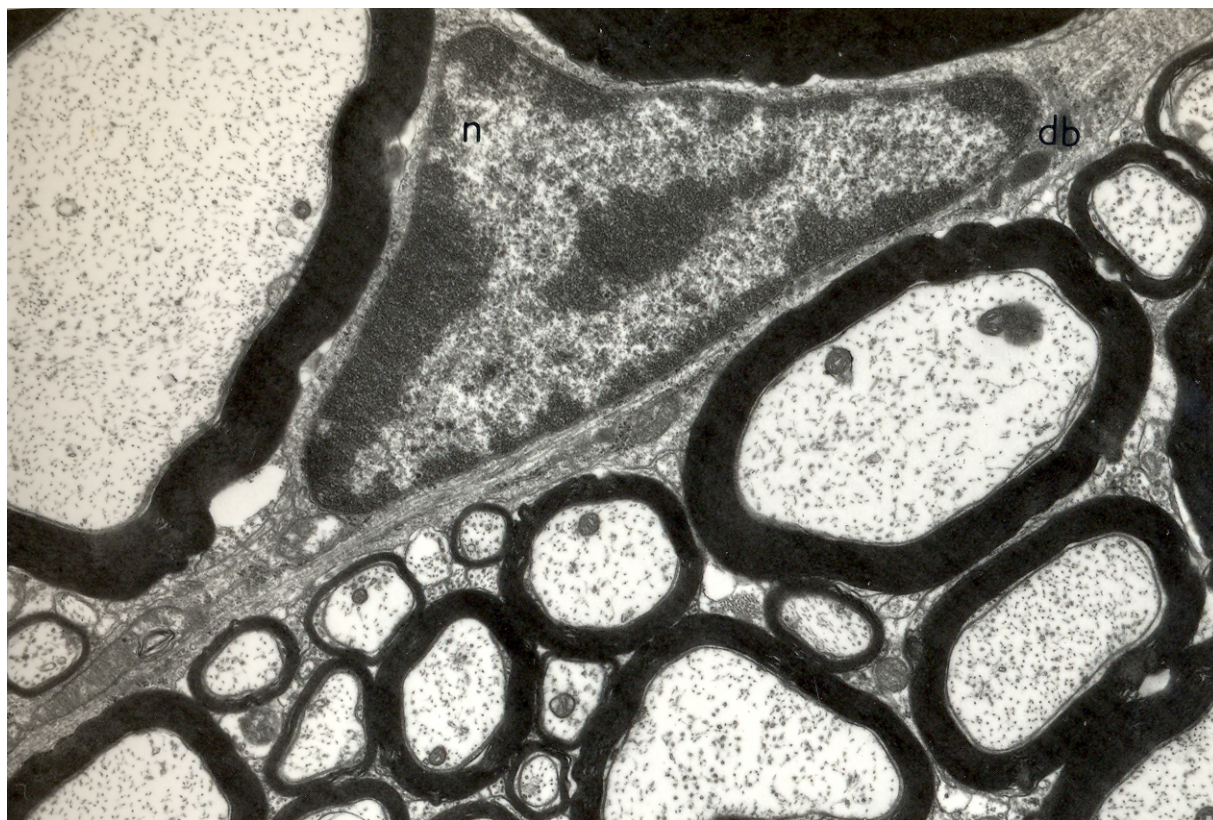


Figura 2 - Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando bainhas de mielina com espessura proporcional ao diâmetro do axônio. n: núcleo de micróglia. db: *dense bodies*. Aumento: 10750X. Fonte: (GRAÇA, 1986).

O processo de mielinização envolve importantes interações entre os axônios e as células-bainha. Inicia-se com um sinal do axônio que atua no recrutamento de populações celulares potencialmente mielinizantes, na sua diferenciação e proliferação e iniciação da síntese e da manutenção das moléculas específicas da mielina (GRAÇA, 1988a).

A mielinização é precedida de um grande aumento de divisão celular, também chamada de “gliose mielinizadora”. A mielinização é um fenômeno tardio do desenvolvimento dos mamíferos, que ocorre no período perinatal (BIGNAMI & DAHL, 1994).

É difícil afirmar que a maioria das células gliais no sistema nervoso central origina-se por divisão local. A questão principal é se um precursor dos dois principais tipos de células gliais (astrócitos e oligodendrócitos) existe no SNC como sugerido por estudos *in vitro*, ou se astrócitos ou oligodendrócitos originam-se de diferentes precursores. Na gliose mielinizadora, células GFAP positivas e as células formadoras de mielina aparecem em seqüência, o que sugere a existência de um precursor comum de acordo com os achados *in vitro*. Entretanto, evidências indicaram que o precursor não é tão comum assim (BIGNAMI & DAHL, 1994).

Além da interação entre o axônio e as células-bainha, existe um terceiro elemento que é exigido para estabilizar as relações entre ambos. No SNP este terceiro elemento é constituído por fibras colágenas pré-formadas. Foi sugerido que no SNC a estabilidade é realizada pelo elemento estrutural mais importante do tecido, o astrócito fibroso tipo 2 (GRAÇA, 1988a).

O processo de mielinização se inicia com o envolvimento do axônio por uma projeção da célula-bainha, formando uma espiral frouxa ao redor do axônio. O processo continua com a compactação dessas camadas através da expulsão do citoplasma, formando assim uma estrutura lamelar compacta composta de: bandas eletrodensas espessas, derivadas da aposição das faces citoplasmáticas das membranas chamadas de linha densa principal, e bandas menos eletrodensas, derivadas da aposição das faces externas das membranas, denominadas de linhas intraperiódicas (GRAÇA, 1988a).

A microscopia eletrônica foi fundamental para o desenvolvimento destes conceitos que têm base na arquitetura molecular dos internodos de mielina e sobre as alterações patológicas que resultaram de doenças hereditárias ou adquiridas da mielina (TRAPP & KIDD, 2004).

### 1.2.1 Mielinização pela Célula de Schwann

A mielinização no SNP pode ocorrer de duas maneiras, como descrito anteriormente. A maioria dos axônios acima de 1  $\mu\text{m}$  de diâmetro são mielinizados. Os axônios são auto limitados por uma membrana plasmática lisa (axolema), que é separada da célula de Schwann que o envolve por uma abertura de 10 a 20 nm (espaço periaxonal de Klebs). O citoplasma do axônio (axoplasma) contém mitocôndrias, cisternas de retículo endoplasmático liso, ocasionalmente ribossomos, grânulos de glicogênio, peroxissomos e vesículas que contêm neurotransmissores. Outras estruturas importantes do axoplasma são as estruturas filamentosas

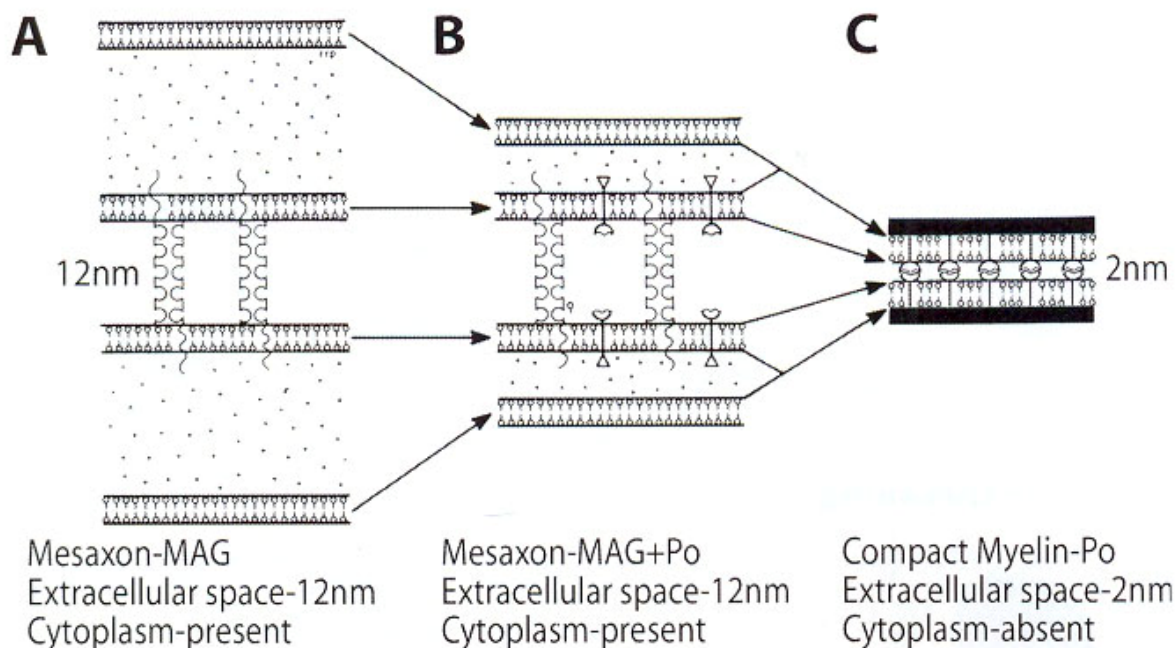
ou tubulares. Microfilamentos de 5 a 7 nm de diâmetro são compostos de cadeias de actina e compõem cerca de 10% do total de proteínas do axônio, e estão confinados à zona cortical imediatamente abaixo do axolema. Nos axônios maiores os neurofilamentos são os principais componentes filamentosos (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

A manutenção do espaço periaxonal de Klebs parece ser realizada pela glicoproteína associada à mielina (MAG), que está presente na membrana periaxonal da célula de Schwann. Os camundongos mutantes que não expressam a proteína MAG não formam o espaço periaxonal e a membrana das células de Schwann se funde com o axolema (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Inicialmente, as células de Schwann mielinizadoras dividem a superfície de membrana em dois domínios. O primeiro domínio é a membrana plasmática abaxonal, que é exposta para interagir com o meio externo ou fluido endoneural. Como parte dessa maturação ocorre a produção da lâmina basal, que é um pré-requisito para a mielinização. O segundo domínio, a membrana adaxonal ou periaxonal, está em contato direto como o axônio e é enriquecido com a glicoproteína associada da mielina (MAG). A membrana axonal envolve (embainha) o axônio radialmente e longitudinalmente e tem um papel importante no direcionamento dos canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) para os nodos. O crescimento espiral dos internodos de mielina é iniciado pela expansão das membranas mesaxonais. Essa membrana conecta as membranas periaxonal e abaxonal e forma parcialmente duas potenciais “margens condutoras” para encapar espiralmente até a superfície periaxonal e abaxonal. Esse desenvolve para dentro do mesaxônio interno ou externo formando internodos mais maduros. Até agora não está bem estabelecido se a expansão espiral ocorre pela rotação de uma ou das duas “margens condutoras”. Nesta etapa, a membrana mesaxonal expande pela rotação sobre ela mesma ou sobre o axônio. A membrana da espiral mesaxonal também contém MAG, e é ultraestruturalmente caracterizada por uma abertura de 12 a 14 nm entre seus folhetos extracelulares. O citoplasma das células de Schwann está separado em folhetos citoplasmáticos de membranas mesaxonais, mas contém algumas organelas. Até que algumas espirais são formadas e o citoplasma entre as membranas mesaxonais é eliminado, e uma densa linha de mielina compacta é formada. Simultaneamente a esse processo o espaço entre os folhetos extracelulares diminui de 12 a 14 nm para apenas 2 nm de mielina compacta (Figura 3) (TRAPP et al., 2004).

A proteína  $P_0$ , principal proteína estrutural da mielina compacta do SNP, não foi detectada nas primeiras voltas mesaxonais durante a mielinização normal. Isto ocorre porque a presença de  $P_0$  nas membranas mesaxonais se dá em níveis não detectáveis por métodos usuais

ou porque a transição para a mielina compacta ocorre tão rapidamente que os estágios intermediários não são detectáveis (TRAPP et al., 2004). Portanto, a mielina é formada pela fusão das membranas das células de Schwann, que é representada na microscopia eletrônica como estruturas lamelares com 12 a 18 nm de intervalo. Bioquimicamente a mielina é formada de 75% de lipídeos e 25% de proteínas. Cerca de 70% da proteína da mielina é a  $P_0$ , uma glicoproteína de 30 KDa (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997; TRAPP & KIDD, 2004); outras proteínas incluem a P1 e P2 (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).



**Figura 3 - Diminuição do espaço extracelular, com a retirada da MAG e a compactação da mielina com a presença da  $P_0$ . Fonte: (TRAPP et al., 2004).**

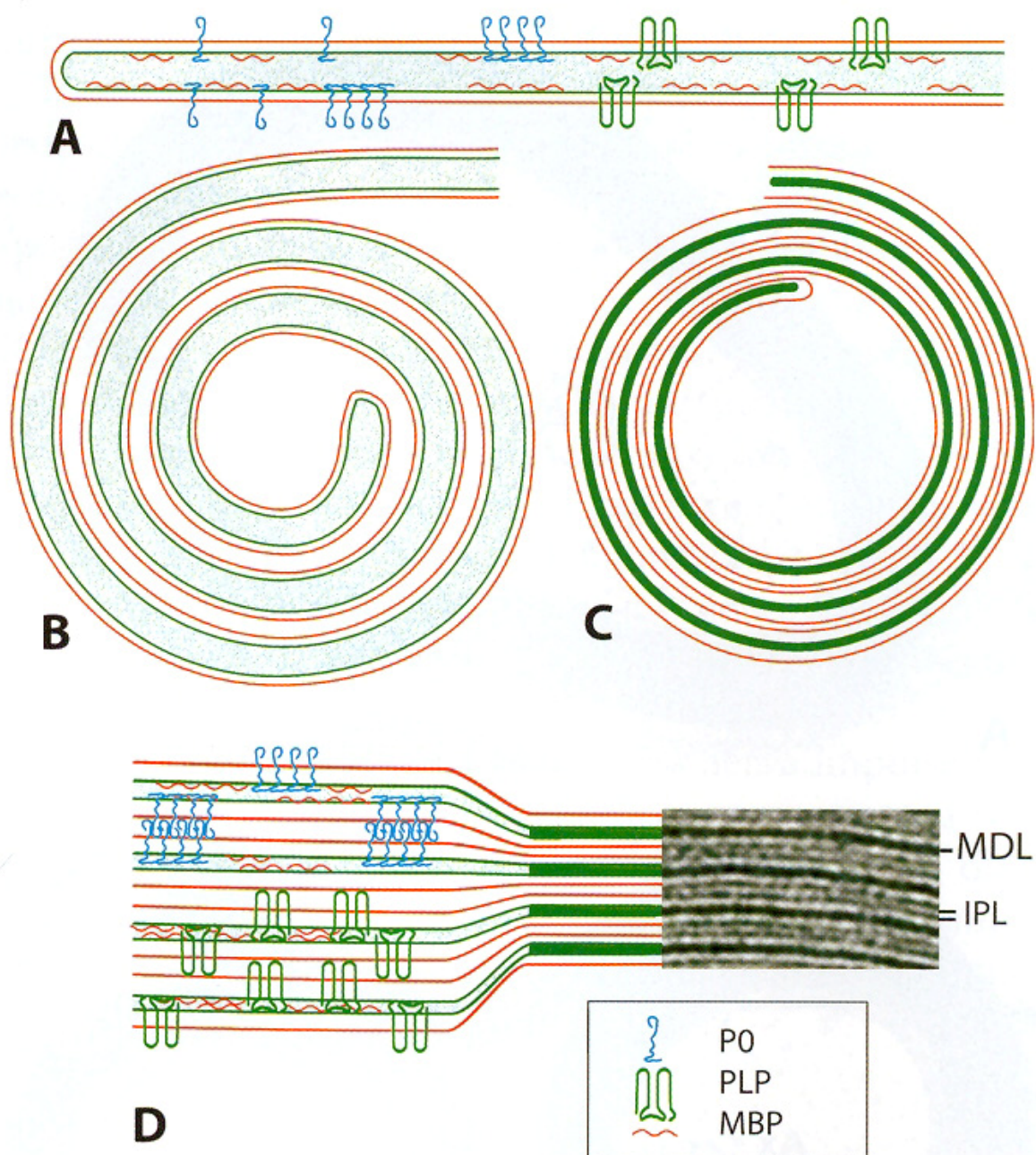
Um componente importante da bainha de mielina no SNP são as incisuras de Schmidt-Lanterman, que consistem de espirais contínuas de citoplasma das células de Schwann que atravessam a mielina compacta a partir do compartimento citoplasmático externo ou nuclear até o compartimento citoplasmático interno ou paraxonal, com uma forma oblíqua com  $90^\circ$  ao longo do eixo da bainha. As fendas abrem as membranas citoplasmáticas na linha densa principal e formam uma rota para a passagem de substâncias através da bainha de mielina, unindo a camada citoplasmática externa à camada citoplasmática interna (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997). As incisuras contêm corpúsculos densos limitados por membrana, lisossomos, ocasionalmente mitocôndrias e um único microtúbulo que está associado ao transporte e a estabilidade e a espiral citoplasmática. O número de incisuras de Schmidt-Lanterman está diretamente relacionado ao diâmetro do axônio, quanto maior a fibra, mais

incisuras apresenta. A presença dessas incisuras durante a mielinogênese indica que este é um componente importante da bainha (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997).

Em nível molecular, a conversão da membrana mesaxonal para mielina compacta durante a mielinização normal envolve duas etapas: a remoção da MAG e a adição da proteína  $P_0$ . A remoção do MAG é absolutamente necessária para a conversão da membrana mesaxonal em mielina compacta, pois quando o  $P_0$  e MAG estão na mesma membrana espiralada, o domínio extracelular grande do MAG domina o espaço entre as membranas (TRAPP et al., 2004).

A conversão da membrana mesaxonal em mielina compacta parece ser governada por uma adesão trans homofílica forçada da proteína  $P_0$ . Complexos tetraméricos de  $P_0$  se conectam de maneira homofílica a tetrâmeros de  $P_0$  em orientações opostas nas membranas plasmáticas opostas (Figura 4) (TRAPP et al., 2004). Esses tetrâmeros ocorrem pois a  $P_0$  é uma glicoproteína de transmembrana do tipo I que possui um domínio transmembrana, um carbono terminal citoplasmático e um único domínio extracelular tipo imunoglobulina. As interações moleculares responsáveis pela adesão homofílica do  $P_0$  foram atribuídas ao domínio extracelular de  $P_0$ . Esses domínios extracelulares interagem como tetrâmeros ligados em cis que se ancoram através de pontes de hidrogênio em outros tetrâmeros que se encontram em orientação oposta na membrana plasmática oposta (Figura 4) (TRAPP & KIDD, 2004).

Os nodos de Ranvier são estruturas importantes da bainha de mielina. Ranvier sugeriu que esta constrição prevenia a perda ou o fluxo de mielina semi-líquida ao longo da fibra nervosa, sugeriu também que a abertura na bainha de mielina permite a difusão de nutrientes dentro do axônio. Em fibras nervosas adultas normais os segmentos internodais entre os nodos de Ranvier variam de 200 a 1500  $\mu\text{m}$  de comprimento. Os nodos de Ranvier possuem especializações das células de Schwann e das bainhas de mielina. A bainha de mielina termina em estruturas tipo alças dilatadas, que estão justapostas à superfície axonal. Ocasionalmente estruturas tipo desmossomos são formadas entre algumas alças terminais. A abundância de mitocôndrias no citoplasma paranodal indica que ocorre uma grande requisição de energia nos nodos. Nos centros dos nodos há a formação de processos chamados vilos, que são projeções do citoplasma com 70 a 100 nm de diâmetro, esses vilos estendem-se para o interior da abertura nodal e se interdigitam com processos da célula de Schwann adjacente. Esse padrão de entrelaçamento é mais proeminente e complexo nas fibras maiores (ORTIZ-HIDALGO & WELLER, 1997) (Figura 5).



**Figura 4 - Esquema da periodicidade da compactação da mielina.** A mielina compacta pode ser vista como um processo celular (A). Os processos crescem espiralmente (B) ao redor do axônio, e durante a compactação da mielina (C), o citoplasma (verde) é excluído. Os folhetos da membrana citoplasmática (verde escuro) fusionam para formar as linhas densas principais (D, MDL), enquanto os folhetos extracelulares (vermelho) das lamelas adjacentes se aproximam para formar as linhas intraperiódicas (D, IPL). A orientação de três proteínas que tem papel dominante na integridade da mielina compacta estão representadas. Fonte: (TRAPP & KIDD, 2004).

### 1.2.2 Mielinização pelo Oligodendrócito

O tamanho e a complexidade geométrica dos oligodendrócitos e seus múltiplos internodos de mielina requerem mecanismos especializados para coordenar a síntese, distribuição e alvo de componentes da mielina. Como ocorre nas células de Schwann, os



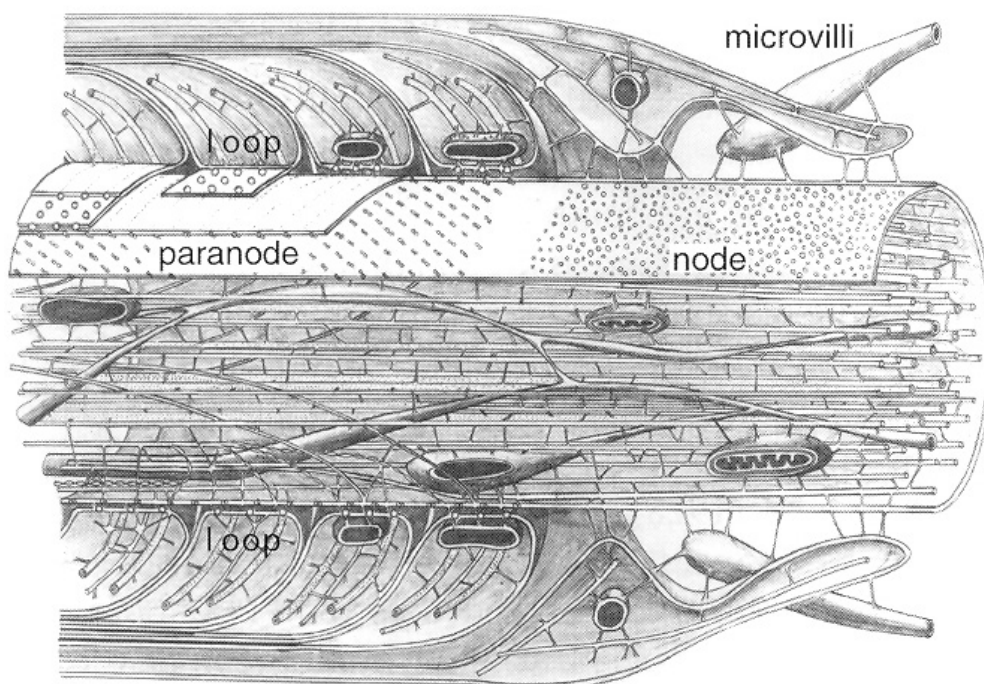
microtúbulos auxiliam o oligodendrócito a organizar a maquinária de síntese e fornecem vias para transportar os produtos do gene da mielina. Em contraste as células de Schwann que formam um internodo de mielina, os oligodendrócitos precisam coordenar a entrega de componentes da mielina para múltiplos internodos de mielina. Para realizar esta tarefa o oligodendrócito desenvolve muitas “estações de biossíntese” no seu citoplasma perinuclear. Essas “estações de biossíntese” podem ser visualizadas na microscopia de luz como protuberâncias citoplasmáticas de onde emergem um ou mais processos. Cada um desses troncos principais podem se ramificar em muitos processos refinados que formam os internodos de mielina no sistema nervoso central (TRAPP et al., 2004). Nas células de Schwann o transporte ocorre de uma maneira linear e bidirecional a partir de uma região perinuclear central. Os oligodendrócitos precisam coordenar a entrega dos componentes da mielina radialmente. Até os componentes da mielina alcançarem o internodo, estes são distribuídos de forma linear e bidirecional, isto ocorre porque o oligodendrócito utiliza uma organização de microtúbulos especializada que não existe nas células de Schwann. A membrana basal de duas células adjacentes é contínua sobre a abertura nodal (TRAPP et al., 2004).

### 1.3 Desmielinização

No processo de desmielinização não há lesão axonal, distinguindo-se dessa forma da degeneração walleriana, processo onde a degradação da mielina é consequência da degeneração axonal. A desmielinização está envolvida em vários processos patológicos no homem e nos animais, e pode ser o principal componente de doenças como esclerose múltipla no homem, cinomose nos caninos, ou como alterações secundárias em processos inflamatórias ou imunomediados (GRAÇA, 1988a).

Vários modelos de desmielinização têm sido aplicados ao longo dos anos para esclarecer esse processo, com diferentes técnicas como: injeção de vírus que lisam oligodendrócitos, como o da hepatite do camundongo (JHM). Indução de reações imunológicas contra células que expressam antígenos virais, induções de reações imunológicas *in vivo* pela injeção intradérmica de cérebro emulsionado e *in vitro* pela adição de soro mielintóxico a culturas de células gliais, injeções locais ou sistêmicas de agentes mielintóxicos, ou uso de pressão sobre a mielina. Após a lesão na substância branca, a mielina sofre degradação associada à infiltração macrofágica da área. Algumas alterações podem ocorrer na bainha de mielina antes dessas serem fagocitadas, tais como a vesiculação e a formação de favos, a micropinocitose vermiforme e o desnudamento, associado à profunda

infiltração macrofágica. Os axônios desmielinizados podem ser remielinizados ou podem permanecer sem a bainha de mielina e ficar separados por processos astrocitários. Na ausência de astrócitos os axônios se aglutinam (GRAÇA, 1988a).



**Figura 5 - Esquema ilustrativo de um axônio no SNP onde o internodo é recoberto por microvilos das células de Schwann, que se entrelaçam com os microvilos da célula adjacente. Fonte: (TRAPP et al., 2004).**

A conexina 32 é uma proteína das junções comunicantes presente nos domínios não compactados da bainha de mielina, que cria uma via radial para difusão de substâncias. Essa função está mais bem explicada na seção destinada as conexinas (seção 1.8). O bloqueio dessa via ocorre no camundongo KO ou em outras mutações espontâneas em humanos. Essas alterações causam patologias próprias como aumento do colares periaxonais e não compactação da bainha. O camundongo KO para conexina 32 é usado como modelo experimental da neuropatia Charcot-Marie-Tooth, mais especificamente da forma dominante ligada ao cromossomo X. Os animais com mais de 3 meses desenvolvem um processo de desmielinização mediado por macrófagos (KOB SAR et al., 2002).

#### **1.4 Remielinização**

A remielinização é um processo regenerativo natural que causa melhoria sintomática, mas é extremamente restrita (FRANKLIN & GOLDMAN, 2004; BALABANOV & POPKO, 2005) e ineficiente nas desordens com desmielinização crônica (BALABANOV & POPKO, 2005). Entretanto, apesar do processo de reparo da mielina não prover a cura, ele oferece ao

paciente a oportunidade terapêutica de aumentar a recuperação funcional e a qualidade de vida (BALABANOV & POPKO, 2005).

A remielinização de axônios no SNC por células de Schwann foi relatada após desmielinização induzida por lisolectina em ratos e em gatos. O mesmo processo ocorre no SNC do rato após desmielinização induzida por 6-aminonicotinamida. Em todos os casos a presença de células de Schwann dependeu da ausência de astrócitos na área (GRAÇA, 1989b).

Há algum tempo foi demonstrado que a remielinização mediada pelo transplante de oligodendrócitos pode ser ativada em situações onde a mielinização endógena ou a remielinização foi inibida em um estágio inicial (BARON-VAN EVERCOOREN & BLAKEMORE, 2004).

Evidências genéticas provam que a remielinização difere em várias vias da mielinização do desenvolvimento. O principal achado dessas evidências é que o efeito da inativação do gene (Olig1) que codifica o fator 1 de transcrição do oligodendrócito (Olig1) é evidentemente heterogêneo durante a mielinização e remielinização. Em estudos com camundongos mutantes do Olig1, os animais mostraram padrões normais de mielinização durante o desenvolvimento; quando ocorre um evento desmielinizador, no entanto, a remielinização é deficiente. Esse camundongo gera uma intensa resposta de proliferação e recrutamento de oligodendrócitos, porém essas células não conseguem se diferenciar em oligodendrócitos maduros e remielinizar axônios eficientemente. Sugere-se que o gene Olig1 é essencial para o processo de remielinização mas não para a mielinização durante o desenvolvimento (BALABANOV & POPKO, 2005).

As proteínas Olig1 e Olig2 pertencem a uma família recentemente descrita como fator de transcrição. Inicialmente essas proteínas foram envolvidas na criação do neurônio motor e na oligodendrogênese durante o desenvolvimento. Camundongos KO para Olig1 e Olig2 e somente para Olig2 morrem durante o período perinatal, enquanto o camundongo KO somente para Olig1 não demonstrou anomalias fenotípicas significativas, exceto um súbito atraso na maturação dos oligodendrócitos; mesmo assim, os oligodendrócitos estão normais e a mielinização se completa em torno dos 30 dias pós-natal (BALABANOV & POPKO, 2005).

Estudos recentes demonstram que o processo de remielinização decorrente de resposta à desmielinização é um pouco diferente do processo de mielinização, principalmente na ativação de genes responsáveis pela diferenciação e maturação das células produtoras de mielina como o Olig1 e Olig2 (BALABANOV & POPKO, 2005).

Morfologicamente as bainhas de mielina formadas no processo de remielinização são mais finas e curtas para o padrão de axônios que estão remielinizando (FRANKLIN &

GOLDMAN, 2004). A remodelação das bainhas remielinizadas leva vários meses, mas a relação entre a bainha e o axônio nunca se recupera. As finas bainhas de mielina são especialmente visualizadas em corte transversais semifinos de resina, contra corados com azul de toluidina e visualizados por microscopia de luz ou eletrônica (FRANKLIN & GOLDMAN, 2004).

Na mielinização ocorre uma relação entre o diâmetro do axônio e a espessura e o comprimento do internodo de mielina: o comprimento e a espessura aumentam quando aumenta o diâmetro do axônio. Na remielinização esta relação não é mantida e o internodo diminui suas dimensões com relação ao diâmetro do axônio. Uma explicação para a diferença do tamanho da bainha de mielina em relação ao axônio é a de que durante a mielinização os oligodendrócitos se associam com axônios que estão em uma fase de crescimento, e na remielinização as células remielinizadoras se associam com axônios maduros com um diâmetro estabelecido. Portanto, durante a mielinização o oligodendrócito responde ao aumento do axônio com um aumento da síntese de mielina aumentando assim a espessura e o comprimento do internodo, mantendo dessa maneira uma íntima associação com a área axolemal. No caso da remielinização o oligodendrócito se associa a um axônio estático de diâmetro constante e produz uma bainha de mielina com dimensões padrões normais, sem se importar com o diâmetro do axônio desmielinizado. Essas explicações se tornam mais complexas se considerarmos que o axônio sofre mudanças de tamanho na desmielinização e remielinização, e que todo esse processo é regulado por fatores intrínsecos e induzido pela glia (FRANKLIN & GOLDMAN, 2004).

A identificação de áreas de remielinização pode ser mais fácil em algumas regiões da substância branca do que em outras. A identificação é mais fácil em locais onde a remielinização após a desmielinização ocorre em axônios de maior diâmetro como nos pedúnculos cerebelares e várias regiões da medula espinhal, e é mais difícil no corpo caloso, onde as fibras têm um diâmetro menor (BECKER & GREEN, 2002).

A fonte de novos oligodendrócitos na remielinização é objeto de discussão, mas um consenso é de que a maioria provém de OPCs. As células progenitoras estão localizadas na zona subventricular de onde são recrutadas quando a desmielinização ocorre em área próxima. Um passo importante da remielinização é o povoamento da área de desmielinização com células progenitoras suficientes, isso pode ser conseguido com células já presentes na área desmielinizada ou pelo recrutamento dessas células de regiões intactas de substância branca ao redor da desmielinização. Esse passo envolve proliferação e migração das OPCs. O sucesso da remielinização depende da correta exposição das OPCs a sinais ambientais apropriados que

medeiam as fases de recrutamento e de diferenciação. As quimiocinas e as citocinas podem estar envolvidas na etapa de proliferação, bem como moléculas da matriz extracelular que podem afetar as fases de proliferação e migração. Um padrão de expressão de PDGF e FGF foi descrito durante a remielinização em modelos experimentais. Ambos possuem efeitos mitogênicos e pró-migratórios e estão envolvidos na fase de recrutamento (BECKER & GREEN, 2002).

### **1.5 Modelo do Brometo de Etídio (BE)**

O Brometo de Etídio é um corante púrpura fluorescente, que atua por intercalação nos ácidos nucléicos (GRAÇA, 1989a; FERNANDES et al., 1997; BECKER & GREEN, 2002) e é usado como agente tripanocida (GRAÇA, 1989a). O Brometo de Etídio atua impedindo a replicação do DNA e rompendo o RNA, inibindo a síntese de proteína e a morte celular (BECKER & GREEN, 2002).

No modelo experimental ele é gliotóxico, atuando de maneira seletiva no SNC e SNP e determinando desmielinização primária, dose dependente, com preservação das estruturas vasculares (GRAÇA, 1989a; FERNANDES et al., 1997). Ele atua matando os oligodendrócitos, bem como os astrócitos e os precursores de oligodendrócitos (BECKER & GREEN, 2002).

Os axônios desmielinizados pelo BE são posteriormente remielinizados por células de Schwann quando se localizam sob a pia e no centro da lesão - áreas que não contém astrócitos, e por oligodendrócitos na periferia das lesões - áreas que contém astrócitos. A atividade celular característica das lesões é mostrada na Figura 6.

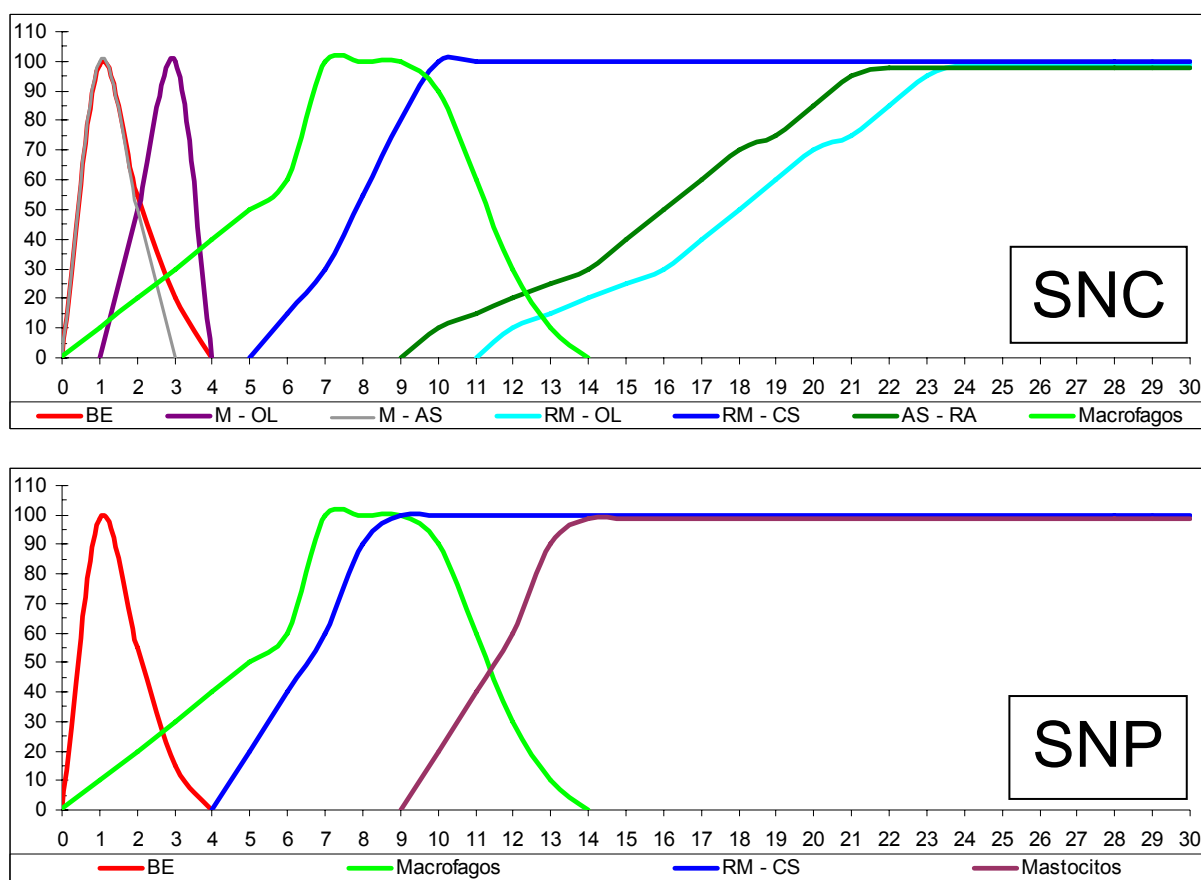
Nas lesões onde ocorre desmielinização lenta, as células de Schwann não encontram matriz estável para remielinizar os axônios desmielinizados. Estas células migram entre os axônios e usam umas às outras para se locomoverem, para isso fabricam fibras colágenas de pequeno diâmetro, que são observadas entre as duas células de Schwann contíguas. Isso confirma a necessidade do colágeno como terceiro fator para que ocorra a mielinização pela célula de Schwann (GRAÇA, 1989b).

A remielinização eficiente não ocorre nas doenças desmielinizantes crônicas em humanos e animais, porém é freqüente nos modelos experimentais, principalmente de desmielinização tóxica (GRAÇA, 1989b; BECKER & GREEN, 2002).

A interação das células de Schwann com os axônios pode ocorrer de diversas maneiras, de acordo com a localização destes dentro da lesão e com a ausência ou presença de componentes da matriz no espaço extracelular. Em locais onde existem fibras colágenas e

substância floculada extracelular a remielinização é mais rápida, geralmente isso ocorre próximo das superfícies piais e dos vasos do centro da lesão (GRAÇA, 1989b).

As células de Schwann podem se associar com os axônios de duas maneiras, com um axônio de grande diâmetro ou com vários axônios de tamanhos variados. Quando ocorre com vários axônios, ocorre a divisão dessas células e cada célula filha se relaciona com um axônio e o remieliniza. Em áreas nas quais se formam membranas derivadas de mielina, a interação entre as células de Schwann e o axônio pode ser incompleta e assim a membrana basal não se forma totalmente ao redor da célula (GRAÇA, 1989b).



**Figura 6 - Gráficos demonstrando as alterações fisiopatológicas que ocorrem no SNC e SNP durante o processo de desmielinização e remielinização no modelo de brometo de etídio em ratos Wistar. Legenda: BE: ação do BE. M-OL: morte de oligodendrócitos. M-AS: morte de astrócitos. RM-OL: remielinização pelos oligodendrócitos. RM-CS: remielinização pelas células de Schwann. AS-RA: reação astrocitária. Macrófagos: presença desse tipo celular na lesão. Mastócitos: presença desse tipo celular na lesão.**

Nesse modelo experimental podem ocorrer variação na velocidade de degradação da mielina e diferenças na velocidade de remielinização pelas células de Schwann dos axônios desmielinizados. Nas lesões rápidas, onde os macrófagos desnudam os axônios, as células de Schwann a partir das áreas subpiais e espaços perivasculares mielinizam rapidamente. Nas lesões lentas, onde há acúmulo de membranas derivadas de mielina e espaços extracelulares

vazios, a associação das CS com os axônios ocorre de maneira incompleta, e a remielinização só ocorre quando os restos de mielina são removidos por fagócitos (GRAÇA, 1989b)

## 1.6 Junções Oclusivas

As junções oclusivas estão localizadas na região mais apical das membranas laterais das células epiteliais e sua principal função é formar uma barreira física primária para a difusão de solutos através da via paracelular (GOW, 2004). Em cortes finos de microscopia eletrônica as junções oclusivas aparecem como locais de fusão aparente onde estão envolvidos os folhetos externos da membrana plasmática de células adjacentes (MORITA et al., 1999); essas placas estão frequentemente associadas ao citoesqueleto (GOW, 2004). Evidências até agora sugerem que o domínio das proteínas da zona ocludente, ZO-1, ZO-2 e ZO-3, podem constituir o principal componente do citoesqueleto devido à sua abundância e o desenho modular que o acomoda; desta maneira, interações com as proteínas da membrana integral das junções ocludentes, bem como os membros da família ocludina e claudina, que são ligadas aos filamentos de actina e miosina (GOW, 2004).

Uma série de proteínas está presente ou associada especificamente com as junções ocludentes, formando desta maneira uma rede molecular esticada a partir das abas das junções ocludentes até o citoesqueleto (CEREIJIDO et al., 2002).

### 1.6.1 Claudina

O primeiro componente transmembrana identificado foi a claudina, que, como um constituinte das junções, na maioria dos tipos celulares, é fosforilado sob condições que regulam a construção das junções oclusivas (GOW, 2004). A proteína claudina 1, que tem homologia limitada com a ocludina, é também responsável por reunir fibrilas intramembranas em fibroblastos transfectados, indicando sua participação nas junções oclusivas (GOW, 2004). Dados subsequentes relataram a homologia da família das claudinas com a sua distribuição em vários tipos de tecidos e anticorpos contra essas proteínas demonstraram a localização das mesmas nas junções oclusivas *in vivo* e *in vitro* (GOW, 2004).

O tamanho da família claudina está estabelecido em 20 genes em camundongos e humanos onde a localização cromossômica da maioria desses genes está estabelecida em uma ou ambas dessas espécies (GOW, 2004).

A claudina 11 foi inicialmente isolada como uma proteína específica do oligodendrócito (OSP) em uma exposição diferencial na parte dorsal da medula espinhal em

relação à parte ventral do camundongo, tendo sido designada para identificar os genes envolvidos na mielinogênese. A claudina 11 é levada até os processos dos oligodendrócitos logo após eles entrarem em contato com o axônio e persistem nas bainhas de mielina maduras como uma proteína relativamente abundante compreendendo aproximadamente 7% da proteína total em roedores. Entretanto, a expressão da claudina 11 não é limitada ao sistema nervoso central e esta é expressa amplamente durante o desenvolvimento bem como em muitos tecidos adultos (GOW, 2004). No período pós-natal a claudina 11 é expressa no testículo, leptomeninges, plexo coróide, substância branca do SNC e ouvido interno (GOW, 2004). Em alguns tecidos, como as células de Sertoli no testículo e nas bainhas de mielina no SNC são claramente visíveis e podem estar entremeadas com as junções comunicantes (GOW, 2004).

A claudina 11 esta presente também nas células do plexo coróide, juntamente com a claudina 1 e 2 e está localizada nas junções oclusivas (WOLBURG et al., 2001). No encéfalo as junções oclusivas são bem desenvolvidas nas células endoteliais. Estas células são positivas para a marcação com anticorpo anti-claudina 11 (MORITA et al., 1999). Esses dois tipos de células fazem parte de duas barreiras importantes para o SNC a barreira hemato-flúido cérebro espinhal no plexo coróide e a barreira hemato-encefálica nas células endoteliais (WOLBURG et al., 2001).

A distribuição da claudina 11 na bainha de mielina difere da maioria das proteínas estruturais que foram caracterizadas nesta membrana. Nas fibras mielinizadas de tamanho pequeno a claudina 11 é usualmente localizada em canais estreitos contínuos preenchidos com citoplasma que desenham como espirais frouxas de uma extremidade a outra ao longo da bainha de mielina. Outras proteínas estruturais como PLP1 e MBP são invariavelmente distribuídas através da bainha de mielina. Em bainhas de mielina de diâmetro maior, a claudina 11 exhibe uma distribuição muito mais complexa. Em primatas, por exemplo, a marcação em imunofluorescência nessas fibras mostra canais em espiral em cada região paranodal da bainha de mielina. Um canal frouxo em espiral atravessa a bainha entre os dois paranodos; essa conformação é remanescente da distribuição nos roedores, além desse canal frouxo, espirais curtas apertadas emanam desses canais em intervalos regulares e refletem a presença de citoplasma que cursam através da mielina compacta, as chamadas incisuras de Schmidt-Lantermann (GOW, 2004).

A formação de junções ocludentes é normalmente associada com um estado de quiescência onde não há proliferação e nem migração. Contrariamente, a ativação da integrina associada a proteínas da superfamília transmembrana 4, está associada ao crescimento celular



e à migração, sugerindo que a interação desse complexo juntamente com o OSP/Claudina 11 pode estar envolvida com o dinamismo das células (TIWARI-WOODRUFF et al., 2001).

## **1.7 As conexinas e a comunicação no sistema nervoso**

### **1.7.1 Integração Neuroglial**

Por muito tempo acreditou-se que as conexões neuronais sinápticas, sozinhas, garantiam a precisão do processamento das informações. Porém, nos últimos anos, vêm crescendo as pesquisas que apontam para a interação entre os neurônios e as células gliais como promotora do funcionamento correto do sistema nervoso (EDENFELD et al., 2005).

O número de células gliais é definido por neurônios que sinalizam a regulação da apoptose. De cada seis células gliais progenitoras, apenas três ou quatro sobrevivem até o final da embriogênese (JACOBS, 2000). As células gliais são especializadas e algumas delas têm que migrar para chegar aos seus destinos finais durante o desenvolvimento do sistema nervoso. A motilidade celular é uma marca das células gliais e suas extensas habilidades migratórias, combinadas com divisão celular incontrolada, podem ser letais, como observado nos gliomas (SOROCEANU et al., 2001; EDENFELD et al., 2005). A função primordial das células gliais é modular e conter o crescimento neuronal, além de dar forma ao circuito nervoso em desenvolvimento. Axônios e dendritos em crescimento não são aptos para navegar livremente em todo e qualquer território, portanto devem ser instruídos a mudar de direção à medida que crescem. Esta seria a função realizada por “células gliais guia”, como as Células Limítrofes Segmentares descritas no sistema nervoso embrionário do gafanhoto. Outro tipo celular conhecido e com função semelhante ao descrito no sistema nervoso embrionário de gafanhoto é a “glia limitante externa”, localizada na zona de transição entre o sistema nervoso central e periférico, a qual define o trajeto que deve ser seguido pelos axônios motores e sensoriais (SEPP et al., 2001) (Figura 7).

Uma via direta para construir os circuitos neuronais funcionais é baseada na habilidade das células gliais em modificar localmente a eficácia das conexões sinápticas. O *clearance* do neurotransmissor L-glutamato, mediado por transportadores de glutamato expressos por glia específica, é necessário para prevenir o estresse oxidativo e a degeneração do neurópilo (SEPP et al., 2001; RIVAL et al., 2004).

O exemplo mais evidente da interação neuroglial pode ser visto na poda de axônios da árvore sináptica, um processo estudado em artrópodes, no qual as projeções exuberantes dos neurônios são removidas das regiões alvo. Outro exemplo são as células perineurais da bainha

glial, que cobrem os processos neuronais para prevenir o contato deles com a hemolinfa como observado na drosófila e no gafanhoto (EDENFELD et al., 2005).

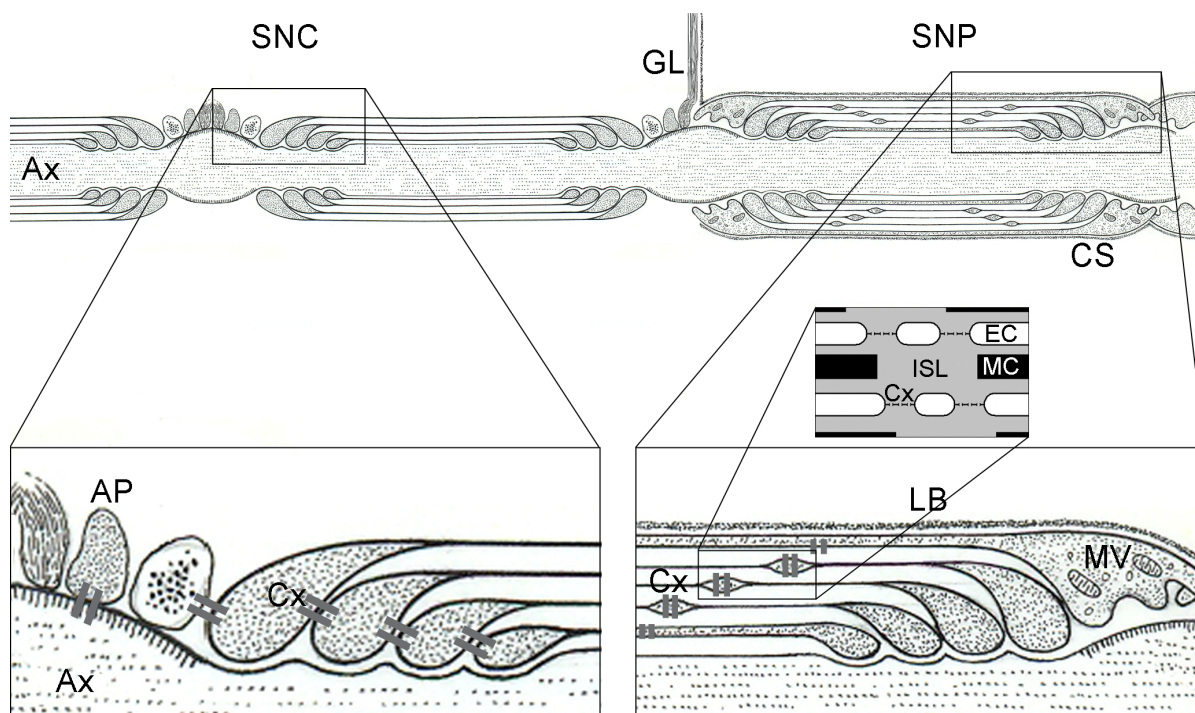


Figura 7 - Representação das bainhas de mielina no Sistema Nervoso Central (SNC), onde os oligodendrócitos realizam a mielinização e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), onde as células de Schwann (CS) fazem a mielina. A membrana glial limitante externa (GL), formada por prolongamentos astrocíticos (AS), que separa o SNC do SNP. No detalhe do internódo do SNC mostrando as conexinas (Cx:≡) entre o axônio (Ax) e o astrócito perinodal (AP). No detalhe do SNP uma bainha de mielina que possui incisuras de Schmidt-Lantermann (ISL), onde estão presentes conexinas (Cx:≡) na membrana celular interrompendo os espaços extracelulares (EC) e a mielina compacta (MC) (detalhe menor). Possui também microvilos (Mv) e uma lamina basal (LB) como revestimento. O limite entre os dois sistemas é o astrócito perinodal (AP), que também possui junções comunicantes (Cx:≡) com o axônio. (Adaptado de: (GRAÇA, 1986))

Os contatos das células gliais são caracterizados por arranjos regulares de septos eletrodensos chamados de Junções de Septos Pregueados, os quais giram o espaço intermembranoso. Algumas proteínas já foram identificadas como sendo expressas com essas junções, sendo necessárias para a integridade do selo transepitelial. Para algumas dessas proteínas, já está determinada a expressão pelas células gliais. Dados moleculares indicam que as junções paranodais dos mamíferos, que asseguram condutividade elétrica nos nodos de Ranvier, são estruturas homólogas às observadas nas junções presentes no sistema nervoso dos insetos (EDENFELD et al., 2005).

## 1.8 Conexinas

As junções comunicantes (junções gap) são sítios na membrana celular com canais intercelulares compostos por doze subunidades (proteínas conexinas). Cada célula “conectada” contribui com um conexon ou hemicanal, constituído por seis subunidades de

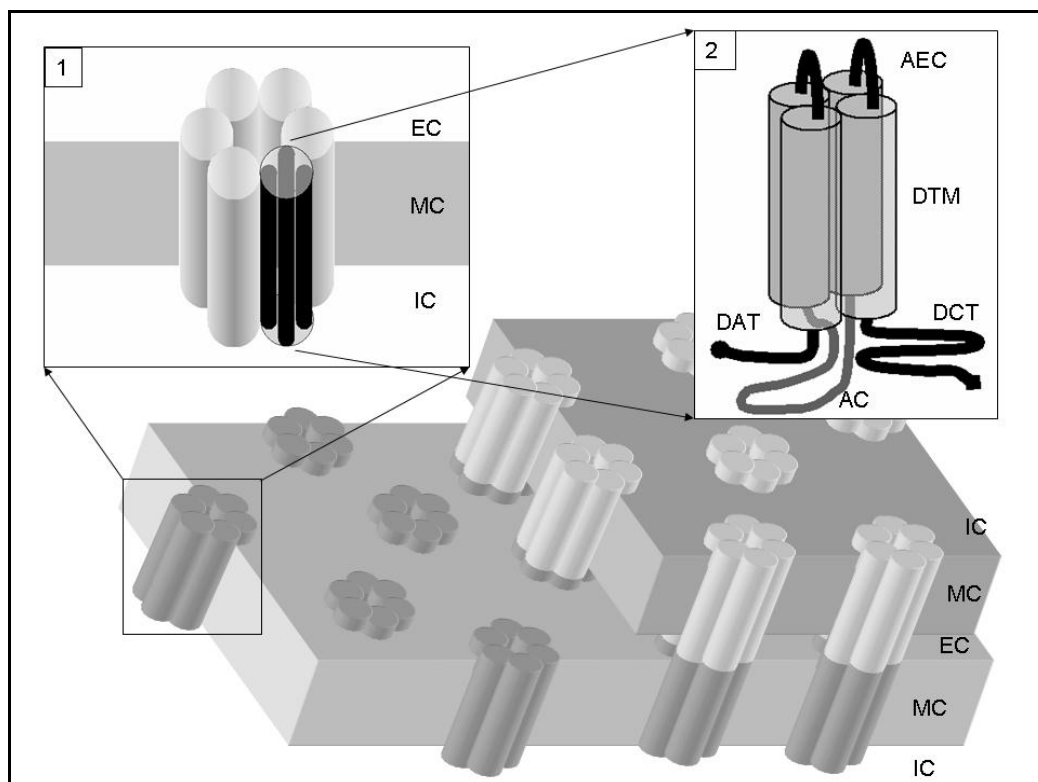
conexina (ROZENTAL et al., 2000b). Este tipo de ligação representa uma maneira eficiente de comunicação intercelular em muitos tecidos, incluindo o tecido nervoso (DERMIETZEL & SPRAY, 1993), e funciona como passagem para trocas de íons, mensageiros secundários e metabólitos entre as células (DERMIETZEL & SPRAY, 1993). As junções comunicantes são permeáveis a moléculas de até 1 KDa (DERMIETZEL & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b; CONTRERAS et al., 2004; KIELIAN & ESEN, 2004; SOHL et al., 2005) e estão presentes em todos os tipos celulares, com exceção dos eritrócitos circulantes, espermatozóides e células de músculo esquelético maduras e inervadas (ROZENTAL et al., 2000b). A expressão de conexinas e a comunicação intercelular através das junções comunicantes são importantes para regular funções como motilidade celular, proliferação e sobrevivência (SOROCEANU et al., 2001; LI et al., 2005).

Já foram identificadas 20 conexinas em roedores e 21 em humanos (SOHL et al., 2004). Em camundongos, as conexinas estão divididas em três grupos: o grupo I ( $\beta$ ) inclui as conexinas mCx26, mCx30, mCx30.2, mCx30.3, mCx31 e mCx31.1 e mCx32; o grupo II ( $\alpha$ ) inclui as conexinas mCx33, mCx37, mCx40, mCx43, mCx46, mCx50 e mCx57. No grupo III ( $\gamma$ ) estão as conexinas mCx36 (ROZENTAL et al., 2000b) e mCx45 (WILLECKE et al., 2002). As conexinas mCx29, mCx39 e mCx47 não estão incluídas em nenhum grupo atualmente. Em humanos, o grupo I ( $\beta$ ) inclui as conexinas hCx26, hCx30, hCx30.3, hCx31, hCx31.1, hCx31.9 e hCx32. No grupo 2 ( $\alpha$ ), estão as conexinas hCx43, hCx46, hCx50, hCx62. Para as conexinas hCx25, hCx30.2, hCx36, hCx40.1, hCx58, hCx47, hCx40 e hCx37 os grupos ainda não estão definidos (WILLECKE et al., 2002).

Os membros da família das conexinas são altamente homólogos e apresentam cerca de 50% de seqüências idênticas de aminoácidos; por outro lado, mostram um padrão diversificado de distribuição tecidual. Estruturalmente, cada conexina atravessa a membrana 4 vezes e tem as porções carboxi e amino terminal na face citoplasmática do canal. As duas alças extracelulares são altamente conservadas e possuem 3 cisteínas em cada alça, posicionadas de forma idêntica nas 12 conexinas (Figura 8).

As conexinas são expressas em um padrão sobreposto de distribuição tecidual, de modo que mais de um tipo de conexina pode ser expresso por uma única célula. Cada célula contribui com um hemicanal ou conexon que tem afinidades seletivas por um outro, podendo formar junções homotípicas, heterotípicas ou heteroméricas. As junções do tipo homotípicas são formadas por 12 subunidades idênticas de conexinas. Nos canais heterotípicos-homoméricos, todas as conexinas de um conexon são idênticas, mas diferentes das conexinas

do conexon da outra célula. Nos canais heteroméricos há mais de um tipo de conexina em cada conexon (ROZENTAL et al., 2000b). A complexidade que ocorre nos canais heteroméricos e heterotípicos é limitada pelas diferentes afinidades das conexinas por outras de mesmo tipo ou de tipos diferentes. Algumas conexinas só formam canais funcionais se conectadas com tipos específicos de conexinas. A Cx40 é um exemplo de conexina muito específica que só é pareada com ela própria; já a Cx43 pode se conectar com outros tipos de conexinas. Outro exemplo interessante é o das Cx31,1 e Cx33 que, curiosamente, não formam canais funcionais entre si e nem com outras conexinas. A Cx33 pode bloquear oligômeros de outras conexinas, agindo assim como uma anticonexina ou uma conexina negativa dominante (DERMIETZEL & SPRAY, 1998).



**Figura 8 - Esquema demonstrando uma junção comunicante entre duas células: os canais unem dois espaços intracelulares (IC) através de duas membranas (MC) No detalhe 1: Conexon transpondo a MC de uma célula, formando um poro com 6 conexinas, No detalhe 2 uma conexina formada por 4 domínios transmembrana (DTM), duas alças extra citoplasmáticas (AEC), uma alça citoplasmática (AC), um domínio amino terminal (DAT) e um domínio carboxi terminal (DCT).**

### 1.9 Conexinas no Sistema Nervoso

As junções comunicantes ocorrem na maioria dos tecidos, porém estas estruturas são particularmente importantes no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), locais onde a estrutura tecidual é mais complexa e mais interconectada do que em outros tecidos. No sistema nervoso de mamíferos onze conexinas já foram caracterizadas em

junções comunicantes (Cx26, Cx29, Cx30, Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx43, Cx45, Cx47 e Cx57) em neurônios, células da glia e meninges (NAGY et al., 2004) (Tabela 1).

As principais funções das conexinas no sistema nervoso dos vertebrados envolvem a sincronização de subpopulações específicas de neurônios e a manutenção da comunicação interglial (DERMIETZEL, 1998).

Como as junções comunicantes formadas por diversos tipos de conexons possuem diferentes propriedades funcionais (p.e. permeabilidade, sensibilidade à voltagem e unidade de condutividade), sua expressão em tipos celulares específicos e mudanças em sua expressão durante o desenvolvimento provavelmente são vitais para as funções fisiológicas do encéfalo (ROZENTAL et al., 2000b).

A glia representa a maior população celular conectada por junções comunicantes no SNC. A quantidade de junções comunicantes das células gliais, se comparado com a dos neurônios, é maior e persiste até o estágio adulto. Para astrócitos e oligodendrócitos (macróglia), dezenas de conexinas foram demonstradas (ROZENTAL et al., 2000b).

As junções comunicantes, conforme os tipos de células conectadas podem ser: homólogas, com junção entre células do mesmo tipo, como astrócito-astrócito; heterólogas, como em ligações entre astrócito-oligodendrócito; ou até autólogas (ou homocelulares), no caso de conexões entre estruturas de uma mesma célula (astrócito-astrócito, lamelas de mielina) (NAGY & RASH, 2000).

A conexina 43 é a proteína de junções comunicantes presente em maior quantidade nos mamíferos e é encontrada em quase todos os tecidos (WILLECKE et al., 2002). É a principal conexina formadora das junções comunicantes em astrócitos (ROZENTAL et al., 2000b), sendo encontrada nas células neuroectodérmicas já no início do desenvolvimento (ROZENTAL et al., 2000a).

A detecção de mudanças na expressão de conexinas durante o desenvolvimento do tecido nervoso é um achado intrigante. A predominância inicial é das conexinas 43 e 26 nas células do tecido nervoso embrionário, posteriormente ficando a conexina 26 confinada a uma pequena população de células, células da leptomeninge, células ependimárias e pinealócitos, no encéfalo adulto (DERMIETZEL & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b). O aumento da expressão da conexina 43 ocorre simultaneamente à redução da conexina 26. O desaparecimento da imunoreatividade da Cx26 do encéfalo em desenvolvimento e a expressão da Cx32 coincidem com um evento crítico no desenvolvimento encefálico, i é, a conversão para a forma adulta da Molécula de Adesão da Célula Neuronal (N-CAM), dando um arranjo

apropriado para as células do tecido nervoso e estabilizando as conexões neuronais (DERMIETZEL et al., 1989).

Achados recentes indicam que, além da importância quantitativa na comunicação durante os processos de desenvolvimento e diferenciação, a composição qualitativa das proteínas que formam a junção comunicante é de relevância representativa nos diferentes tipos celulares (DERMIETZEL et al., 1989). Quando a ligação por junções comunicantes ocorre entre diferentes tipos celulares, cada célula contribui com um hemicanal composto de conexinas específicas para o seu tipo celular. Esses canais são apropriados para o transporte de moléculas necessárias à perfeita comunicação dessas células interconectadas. Na formação de junções comunicantes com diferentes tipos de conexinas, ocorre a possibilidade de diferentes fatores reguladores atuarem em cada um dos lados do canal (DERMIETZEL & SPRAY, 1993).

A maioria das junções comunicantes dos oligodendrócitos, cerca de 97%, é realizada com astrócitos. Portanto, as junções comunicantes que os oligodendrócitos formam com os astrócitos intermedeiam a comunicação entre sucessivos oligodendrócitos e, desta forma, permitem que oligodendrócitos distantes participem da comunicação intercelular, formando um sincício panglial abrangente (RASH et al., 2001).

Estima-se que mais de 80% das ligações oligodendrócito-astrócito (O/A) contenham Cx30 e Cx 43 em sua porção astrocítica, e que mais de 70% das ligações O/A contenham Cx26 e Cx43, sugerindo que a porção astrocítica, de pelo menos 56%, das ligações O/A apresentem todas as três conexinas astrocíticas (NAGY et al., 2004). Portanto, astrócitos formam duas classes de junções comunicantes, uma contendo Cx43 e Cx30 e outra Cx26, sendo que ambas formam canais heterotípicos O/A e homotípicos A/A. Quando ocorrem ligações heterotípicas, a conexina astrocítica 26 associa-se principalmente com a conexina oligodendrocítica 32 e as conexinas astrocíticas 43 e 30 com a conexina oligodendrocítica 47 (ALTEVOGT & PAUL, 2004).

### 1.9.1 Conexinas em astrócitos e micróglia

Os astrócitos são responsáveis por formar barreiras estruturais nas superfícies vasculares, envolver os neurônios e separar regiões de composições iônicas diferentes ou flutuantes, de forma a compartimentalizar fisiologicamente e metabolicamente vários grupos de neurônios do SNC (NAGY & RASH, 2000). Metabolicamente, os astrócitos contribuem para a homeostase extracelular dos íons  $K^+$  através de um processo conhecido como tamponamento espacial (NAGY & RASH, 2000). Isso envolve a redistribuição célula a célula

do excesso extracelular de  $K^+$  através do citoplasma de uma vasta e interconectada rede de astrócitos contíguos, através de junções comunicantes (NAGY et al., 1996a). Como o tamponamento de íons  $K^+$  ao redor de neurônios foi atribuído aos astrócitos, as junções comunicantes proporcionam uma via direta de comunicação nos compartimentos perivasculares para a disponibilidade de  $K^+$  (NEWMAN, 1986) e água neste sistema (RASH & YASUMURA, 1999).

No encéfalo maduro a conexina predominante é a Cx43, expressa em astrócitos e células endoteliais, epêndima (LI et al., 2005), leptomeninges (SOHL et al., 2004; LI et al., 2005) e micróglia (SOHL et al., 2004). A Cx43 está envolvida com a regulação da proliferação e migração de diversos tipos celulares. O seu envolvimento com a  $\beta$ -actina é um ponto chave e comprova a sua importância na migração celular (LI et al., 2005).

Os astrócitos expressam a Cx43 e são conectados *in vivo* e em cultura, sob algumas condições. Entretanto, a força dessa ligação e o grau de expressão da Cx43 entre astrócitos variam dependendo da região do encéfalo, sendo a força mais intensa no hipotálamo do que no corpo estriado; essas diferenças podem também ocorrer de acordo com o tipo celular astrocítico (DERMIETZEL & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b).

Os astrócitos também expressam outros tipos de conexinas em menor grau, como Cx26 e Cx30, relacionados à expressão de Cx43. A Cx26 é encontrada em pouca quantidade no encéfalo adulto, no qual ela está confinada às leptomeninges, epêndima, pinealócitos (DERMIETZEL & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b) e neurônios (ROZENTAL et al., 2000b) (Tabela 1). A expressão de Cx43 por células ependimárias e pela micróglia aumenta a quantidade dessa proteína no SNC. A Cx30 foi encontrada em células ependimárias e leptomeningeais próximas a vasos. As células leptomeningeais expressam, além da Cx30, a Cx43 e a Cx26. A micróglia comunica-se entre si através de junções comunicantes que contém a Cx43. Essas junções servem para elaborar a resposta inflamatória no encéfalo e são estimuladas por citocinas inflamatórias (SOHL et al., 2004). No encéfalo do rato normal, 5% da micróglia expressa Cx43; em casos de lesão, este número aumenta para aproximadamente 60% das células microgliais (EUGENIN et al., 2001; KIELIAN & ESEN, 2004). A Cx36 também foi detectada em células amebóides e ramificadas da micróglia (SOHL et al., 2004; DOBRENIS et al., 2005) (Tabela 1). Essa conexina pode estar envolvida na comunicação entre a micróglia e o neurônio, sendo essa comunicação altamente relevante para a neuropatologia. Uma terceira conexina, a Cx45, foi detectada em células da micróglia de camundongos (DOBRENIS et al., 2005).

A expressão da Cx43 em astrócitos é afetada em doenças como a isquemia cerebral e na doença de Alzheimer, duas condições que exibem um grande número de macrófagos/micróglia. Portanto, a micróglia ativada inibe a comunicação via junções comunicantes e a expressão de Cx43 em astrócitos, sugerindo ser capaz de modular a comunicação intercelular glial no SNC (KIELIAN & ESEN, 2004). Na micróglia ativa, a comunicação via junções comunicantes serve para transmitir sinais neuroinflamatórios, maximizando o ataque a um agente bacteriano, de outra forma, esta comunicação pode propagar fatores citotóxicos pró-inflamatórios, diminuindo assim a viabilidade celular (GARG et al., 2005).

Inicialmente, estudos descreveram a presença da Cx26 somente no encéfalo em desenvolvimento, enquanto outros relatos descreveram sua expressão no encéfalo maduro (MIRAGALL et al., 1992; ORSINO et al., 1996), isto devido ao avanço da biologia molecular, principalmente no que concerne às conexinas nas últimas décadas. Durante a ontogenia do encéfalo, as conexinas são expressas de maneira peculiar (ROZENTAL et al., 2000b): as conexinas 26 e 43 são altamente expressas nos primeiros estágios do desenvolvimento. Contudo, a expressão da conexina 26 decai durante o processo, acompanhada de um aumento da expressão da conexina 32, que anteriormente era expressa em quantidades muito baixas (DERMIETZEL et al., 1989).

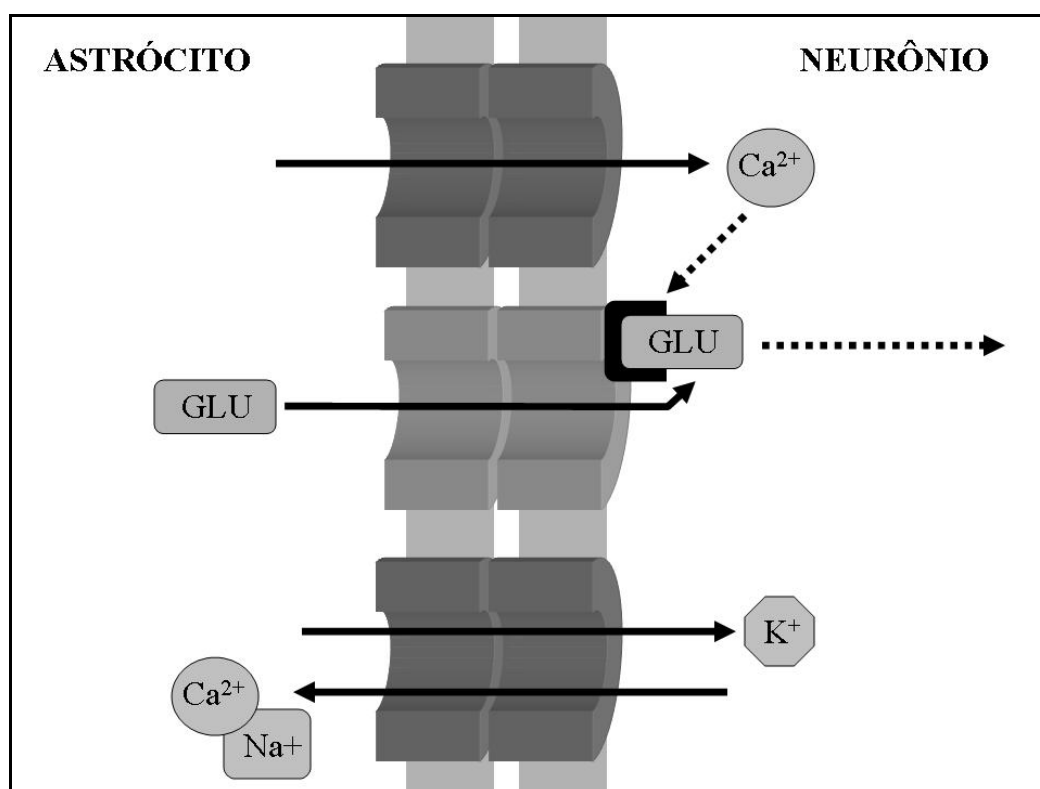
Estudos morfológicos mostram que astrócitos possuem junções autólogas, também chamadas de ligações reflexivas, que ocorrem entre processos de membrana de uma mesma célula, servindo para um possível monitoramento sináptico. Porém, é necessário estudo mais profundo para definir o papel que esse tipo de comunicação exerce (ROZENTAL et al., 2000b). Esse tipo de ligação reflexiva via conexina ocorre também em células de Schwann (SPRAY & DERMIETZEL, 1995) e oligodendrócitos (WOLFF et al., 1998; NAGY & RASH, 2000).

A sinalização intercelular de íons  $Ca^{2+}$  entre neurônios e astrócitos, em cultura mista, foi descrita como sendo unidirecional, dos astrócitos para os neurônios. Por outro lado, a propagação de ondas de  $Ca^{2+}$  dos astrócitos para os neurônios têm sido proposta como dependente da liberação de glutamato dos astrócitos, que requer cálcio e subsequente ativação dos receptores glutamatérgicos neuronais; todo esse processo de troca de íons ocorre via junções comunicantes (ROZENTAL et al., 2000b) (Figura 9).

A participação das junções comunicantes astrocíticas na neuro-proteção tem sido investigada pela comparação da vulnerabilidade neuronal na presença ou ausência de comunicação juncional entre os astrócitos (ROZENTAL et al., 2000b). Em meios onde os



astrócitos estão desconectados, os neurônios expostos a lesões oxidativas têm um aumento das taxas de peróxidos intracelulares e morte celular. Neste mesmo estado de estresse oxidativo, com astrócitos desconectados ocorre um brusco aumento de  $\text{Ca}^{2+}$ , o que indica a participação das junções comunicantes astrocíticas na homeostase do íon (ROZENTAL et al., 2000b). Os níveis de Cx43 estão elevados tanto em astrócitos reativos como em locais ao redor de injeções de ácido cáinico. Entretanto, é obscuro o estado de conexão dessas células nos vários estágios da progressão, de normal a reativa. A Cx43 está aumentada após lesão encefálica provocada por isquemia de grau médio a moderado no corpo estriado, porém está reduzida em regiões com poucos neurônios (NAGY & RASH, 2000). Múltiplos processos reguladores da Cx43, incluindo desfosforilação, dispersão na membrana e internalização, continuam ativos em áreas de lesão neuronal conforme o grau do dano causado (NAGY & RASH, 2000).



**Figura 9 - Esquema representando o transporte de íons, entre os astrócitos e os neurônios. Os íons são transportados através de junções comunicantes. Os íons cálcio atuam sobre os receptores para liberar glutamato no interior dos neurônios.**

Foi sugerido que junções comunicantes astrocíticas devem ser remodeladas após injúria, de modo a redirecionar o fluxo de íons e metabólitos em benefício do tecido sobrevivente (NAGY & RASH, 2000). Este fenômeno atribui uma função neuroprotetora ao

astrócito, estabelecendo desta maneira uma relação entre o *status* dos canais das junções comunicantes dos astrócitos e a vulnerabilidade neuronal a lesões oxidativas (BLANC et al., 1998). Por outro lado, foi descrito que a difusão e amplificação dos sinais de morte celular ocorrem através das junções comunicantes astrocíticas e podem configurar uma propagação secundária de lesão encefálica (ver secção 2.9.3) (LIN et al., 1998).

### 1.9.2 Conexinas nos oligodendrócitos e células de Schwann

Os oligodendrócitos e seus símiles periféricos, as Células de Schwann, expressam uma proteína de junções comunicantes diferente, a Cx32, apesar de uma menor expressão *in situ* do que a Cx43 exibida em astrócitos (DERMIETZEL & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b). Nos oligodendrócitos do encéfalo e medula espinhal encontra-se a Cx32 (NAGY et al., 2004), que está localizada na membrana plasmática nos nodos de Ranvier, na mielina compacta das incisuras de Schmidt-Lanterman e na mielina internodal, formando junções comunicantes autólogas (reflexivas) entre as voltas paranodais e camadas de mielina adjacentes em uma mesma célula (Figura 7), e permite “atalhos” de junções comunicantes entre estas estruturas, similares às que ocorrem na mielina do SNP (SPRAY & DERMIETZEL, 1995; SCHERER et al., 1995; DERMIETZEL et al., 1997). Trabalhos recentes envolvendo diferentes anticorpos para Cx32 reforçam a teoria da associação da Cx32 com as bainhas de mielina (NAGY et al., 2004), principalmente nas fibras de maior diâmetro e a presença de Cx29 nas fibras de menor diâmetro (SOHL et al., 2004).

Os oligodendrócitos apresentam ainda a Cx29 que é encontrada no corpo celular e nos segmentos iniciais dos prolongamentos celulares. A Cx29 está presente na fase de desenvolvimento da árvore oligodendrocítica, porém em menor quantidade do que a Cx32 (NAGY et al., 2004). Outra conexina dos oligodendrócitos é a conexina 47, expressa em grande quantidade no encéfalo e medula espinhal do camundongo adulto (NAGY et al., 2004). Experimento utilizando camundongos knock-out para Cx32 e Cx47 indicam que esses animais tem problemas na mielinização e exibem uma desmielinização mais severa (NAKASE & NAUS, 2004). As Cx32 e Cx 47 estão localizadas também no corpo e no início dos processos oligodendrocíticos; esta localização é maior nos oligodendrócitos da substância cinzenta do que nos oligodendrócitos da substância branca (ALTEVOGT & PAUL, 2004).

A formação das junções comunicantes na mielina do SNC tem como função conectar os compartimentos citoplasmáticos não compactados da camada externa de mielina e elementos astrocíticos que abraçam os compartimentos internodais da mielina (NAGY et al., 2003) (Figura 7). A ocorrência de junções comunicantes entre astrócitos e oligodendrócitos

está bem explicada e inclui participação da Cx43 no lado astrocítico destas junções (NAGY et al., 2003).

As incisuras Schmidt-Lanterman consistem de pequenas dilatações circunferenciais de citoplasma das células de Schwann que invadem toda a extensão da mielina nas regiões internodais. Considerando que as lamelas de mielina ao redor dos axônios formam barreiras impermeáveis à difusão de substâncias, as incisuras de Schmidt-Lanterman fornecem uma rota para suporte metabólico e manutenção das bainhas de mielina; nesses locais há junções comunicantes reflexas entre as membranas citoplasmáticas internas e externas, que promovem uma via, formada de sucessivos canais comunicantes, para difusão radial de íons e metabólitos (NAGY et al., 2003).

As junções homólogas entre oligodendrócitos (O/O) são raras ou inexistentes. Em suas ligações com astrócitos, os oligodendrócitos exibem as Cx32 e Cx47, e possivelmente a Cx29 em suas junções comunicantes (KAMASAWA et al., 2005). Porém, a maioria das junções heterólogas O/A contém Cx47 (ALTEVOGT & PAUL, 2004; KAMASAWA et al., 2005). As junções comunicantes autólogas, presentes nas camadas de mielina, mais precisamente nas incisuras de Schmidt-Lanterman e entre as voltas paranodais, contêm, principalmente e talvez exclusivamente, a Cx32 (KAMASAWA et al., 2005). A Cx47 participa nas junções comunicantes entre as camadas externas da mielina e os astrócitos (LI et al., 2004; KAMASAWA et al., 2005)(Figura 7). No SNP, a comunicação autóloga entre as membranas de mielina que constituem a bainha envolve as conexinas Cx29 e Cx32, localizadas nas alças paranodais e incisuras de Schmidt-Lanterman da mielina periférica (NAGY et al., 2003).

### 1.9.3 Patofisiologia das conexinas

O papel das junções comunicantes tem sido bem elucidado e o tema estudado a fundo quando avaliamos a interação célula-célula. Existem dois efeitos proporcionados pelas junções comunicantes que podem promover a morte ou a vida de quaisquer células unidas por estas junções (ANDRADE-ROZENTAL et al., 2000).

O *bystander effect* (espectador inocente), efeito que promove a morte de células adjacentes a uma célula apoptótica, ocorre devido à passagem de metabólitos tóxicos através das junções comunicantes de células que permanecem apenas como espectadores de uma outra célula alvo para morrer. Da mesma maneira, há o *good Samaritan effect* (efeito do bom samaritano), que proporciona a sobrevida de uma célula outrora programada para morrer devido à drenagem de seus metabólitos tóxicos através das junções comunicantes para células ao seu redor, mantendo todas vivas naquele momento e mantendo a homeostasia tecidual.

Com isso, tem-se uma dualidade no efeito resultante da presença das junções comunicantes, ora atuando de maneira positiva, salvando, ou negativa, executando as células interconectadas por elas (ANDRADE-ROZENTAL et al., 2000; FARAHANI et al., 2005).

De maneira mais abrangente, algumas condições patológicas estão diretamente ligadas às junções comunicantes ou à função alterada das mesmas (ROZENTAL et al., 2000a). Algumas doenças descritas em humanos estão ligadas a mutações em conexinas (LI et al., 2005). Mutações no gene da Cx32 causam uma neuropatia periférica conhecida como doença de Charcot-Marie-Tooth, ligada ao cromossomo X, e é um exemplo amplamente investigado na clínica. Os mecanismos pelos quais as mutações nas Cx32 na doença de Charcot-Marie-Tooth atuam na condutividade nervosa podem ser múltiplos e incluem: tráfico alterado de proteínas para os locais das junções; permeabilidade alterada dos canais e, às vezes, formação alterada dos canais heterotípicos (DERMIETZEL & SPRAY, 1998). Mutações no gene da Cx26 podem levar à forma mais comum de surdez hereditária não-sindrômica.

A estrutura da proteína Cx43 pode estar alterada em situações de focos epilépticos em humanos, nos quais a expressão de mRNA da Cx43 pode ou não estar aumentada. Altos níveis de Cx43 foram observados em placas amilóides  $\beta$ A4-positivo na doença de Alzheimer (NAGY et al., 1996b; NAGY & RASH, 2000), o que indica a invasão destas placas por astrócitos reativos ou uma regulação aumentada de Cx43 nestas células, como visto nas células PC12 com superexpressão de porções carboxi-terminal da proteína precursora do amiloide (LYNN et al., 1995; NAGY et al., 1996a; NAGY & RASH, 2000). Entretanto, a maior presença de Cx43 nessas áreas pode decorrer de macrófagos/micróglia ativadas, presentes nessa região. A diminuição da proteína Cx43 em áreas de infiltrado inflamatório sugere que a presença de fatores como IL-1 $\beta$  estão envolvidos na diminuição da conectividade astrocítica, como observado na encefalomielite experimental auto-imune. Esta mudança na expressão de Cx43 pode modular os processos envolvidos na desmielinização inflamatória, como a que ocorre na esclerose múltipla (BRAND-SCHIEBER et al., 2005). Em certas condições, os astrócitos podem fazer com que a micróglia ativa entre em repouso através de citocinas antiinflamatórias, como TGF- $\beta$ 1 (SCHILLING et al., 2001; HINKEROHE et al., 2005).

Áreas do córtex cerebral, submetidos à hipóxia seguida de re-oxigenação, podem ou não apresentar alteração nos níveis de proteína Cx43 quando detectadas por imunomarcção, a expressão de mRNA, no entanto está aumentada. Mudanças nas proteínas Cx32 e Cx36 também ocorrem, porém sem alterações de expressão no seu mRNA (ROZENTAL et al., 2000a; OGURO et al., 2001).

Um aumento brusco nos níveis extracelulares de glutamato pode levar a sérias conseqüências, uma delas é precipitar a morte celular na forma de uma excitação tóxica pela superestimulação dos receptores ionotróficos do glutamato. Esta situação ocorre em doenças degenerativas como a esclerose múltipla e logo após lesões traumáticas da medula espinhal, e pode ser evitada pelos astrócitos conectados por junções comunicantes funcionais (PITT et al., 2000).

Infecções parasitárias intracelulares como as causadas pelos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* levam a uma diminuição da comunicação intercelular. Esta diminuição ocorre na ausência de alterações na expressão ou na transcrição das conexinas. Observa-se a desorganização das placas de junções comunicantes, presumidamente devido a alterações na estruturação dos conexons (CAMPOS DE CARVALHO et al., 1998). Qualquer que seja o mecanismo envolvido, alterações na Cx43 afetariam dramaticamente a função astrocítica, perturbando o equilíbrio de  $K^+$  na glia e interferindo com a propagação de ondas de  $Ca^{+}$  entre as células da glia e neurônios (ROZENTAL et al., 2000a). O *Staphylococcus aureus* também é capaz de modular a expressão de conexinas e, dessa maneira, inibir a formação de junções comunicantes funcionais, atuando de maneira direta nessa inibição (ESEN et al., 2007).

A expressão de receptores purinérgicos P2Y é alterada em astrócitos da medula espinhal de camundongos *knock out* para Cx43 (ROZENTAL et al., 2000a; SUADICANI et al., 2003) devido à interação entre os receptores P2Y e a CX43 na transmissão intercelular de  $Ca^{2+}$ . Em astrócitos com expressão diminuída de Cx43, ocorre um aumento dos receptores P2Y, bem como uma troca dos receptores P2Y sensíveis à adenina por receptores P2Y sensíveis a uridina (SUADICANI et al., 2003).

Alterações na expressão de conexinas são sabidamente responsáveis pelas anomalias supracitadas; contudo, em alterações neoplásicas do SNC como glioma e glioblastoma, as conexinas não estão alteradas quanto ao seu tipo, embora a relação entre a expressão de conexina e a malignidade do neoplasma sejam inversamente proporcionais (ROZENTAL et al., 2000a; SOROCEANU et al., 2001). Baixa expressão de Cx43 também foi encontrada em astrocitomas (IACOBAS et al., 2004).

A Cx 43 tem um papel importante na supressão do crescimento tumoral, independente da formação de junções comunicantes, através da redução da proliferação celular, sem intensificar o acoplamento via junções comunicantes (NAKASE & NAUS, 2004).

A expressão da Cx43 foi recentemente ligada à morte celular programada, através da expressão alterada da proteína anti-apoptótica bcl-2, por meio da abertura de hemicanais não

juncionais ou por outros mecanismos (IACOBAS et al., 2004). Por outro lado, a proteção contra injúrias, nas células gliais em cultura, pode ocorrer por meio da expressão de Cx43; o efeito protetor não é eliminado quando as células são separadas para limitar a formação de junções comunicantes ou por bloqueadores de canais de conexinas (STOUT et al., 2004). Esse efeito protetor também foi comprovado in vivo (LEE et al., 2005). Estudos relacionaram o aumento da resistência a injúrias mediado por conexina com a reorganização citoesquelética e a rápida normalização de níveis citotóxicos de cálcio das células (STOUT et al., 2004).

A identificação de proteínas com funções celulares específicas é prioritária para a compreensão do funcionamento correto da célula e é um grande avanço para o entendimento da etiologia de doenças neurológicas. A avaliação de mutações em sítios específicos será de suma utilidade para auxiliar o entendimento dos processos degenerativos e regenerativos do SNC, e constitui a base para a identificação e modulação dos processos que prejudicam o retorno do funcionamento dos circuitos após injúrias de várias etiologias.

#### 1.9.4 Conclusão

A complexidade do sistema nervoso central em suas características morfofuncionais não se restringe à sua fisiologia ou mesmo ontogenia, se repete em diversas doenças, notadamente as degenerativas, muitas das quais ainda apresentam etiologia indefinida. Os obstáculos que impedem a regeneração do tecido nervoso têm a mesma origem dos que dificultam a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos.

A ação das junções comunicantes na etiopatogênese e prevenção de doenças degenerativas do sistema nervoso, como a esclerose múltipla, é um dos principais focos de estudo envolvendo as junções comunicantes.

A detecção de alterações nos conexons e nos mecanismos envolvidos no funcionamento das junções comunicantes fornece pontos importantes para concentrar pesquisas envolvendo a determinação da etiologia assim como na instituição de possíveis terapias. Uma maneira de se estudar esse aspecto é através da utilização de modelos de desmielinização em animais geneticamente modificados para proteínas de junções comunicantes presentes no SNC (RAMOS & GRAÇA, 2006) para o melhor entendimento da regeneração nervosa nas doenças degenerativas.

**Tabela 1 - Relação das conexinas nas células do sistema nervoso e a doença ou anomalia causada na presença de mutações.**

Células	Cx26	Cx29	Cx30	Cx31	Cx32	Cx33	Cx36	Cx37	Cx40	Cx43	Cx45	Cx46	Cx47	Cx57
Leptomeningeais	(DERMIETZE L & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b; SOHL et al., 2004)		(SOHL et al., 2004)							(SOHL et al., 2004; LI et al., 2005)				
Ependimárias	(DERMIETZE L & SPRAY, 1993; ROZENTAL et al., 2000b)									(SOHL et al., 2004; LI et al., 2005)				
Neurônios	(DERMIETZE L, 1998; ROZENTAL et al., 2000b)					(RASH et al., 2000; ROZENTAL et al., 2000b)	(ROZENTAL et al., 2000b; DOBRENIS et al., 2005)	(ROZENTAL et al., 2000b)	(ROZENTAL et al., 2000b)	(DERMIETZE L, 1998; ROZENTAL et al., 2000b)				
Astrócitos	(CONTRERAS et al., 2004; NAGY et al., 2004)		(DERMIETZEL, 1998; NAGY & RASH, 2000; DERMIETZEL et al., 2000; CONTRERAS et al., 2004; NAGY et al., 2004)						(DERMIETZEL et al., 2000)	(DERMIETZEL, 1998; ROZENTAL et al., 2000b; NAGY et al., 2004)	(DERMIETZEL et al., 2000; ROZENTAL et al., 2000b; CONTRERAS et al., 2004)	(SCEMES et al., 1998)		
Oligodendrócitos		(NAGY et al., 2003; NAGY et al., 2004; SOHL et al., 2004)			(DERMIETZEL, 1998; ROZENTAL et al., 2000b; NAKASE & NAUS, 2004)						(DERMIETZEL et al., 1997; DERMIETZEL, 1998)		(NAGY et al., 2003; NAGY et al., 2004; NAKASE & NAUS, 2004)	
Micróglia							(SOHL et al., 2004; DOBRENIS et al., 2005)			(EUGENIN et al., 2001; KIELIAN & ESEN, 2004; SOHL et al., 2004)	(DOBRENIS et al., 2005)			
Células de Schwann												(CHANDROS S et al., 1996a; CHANDROSS et al., 1996b)		
Anomalias	Surdez não-sindrômica recessiva (ROZENTAL et al., 2000a)			(SCHERER et al., 1995)*	Doença de Charcot-Marie-Tooth (ROZENTAL et al., 2000a)		Epilepsias hereditárias (ROZENTAL et al., 2000a)			Surdez não-sindrômica (JACOBAS et al., 2004). Astrocitomas (JACOBAS et al., 2004)		Cataratas senis (ROZENTAL et al., 2000a)		(SCHERER et al., 1995)*

As fontes de informações são apresentadas com os números sobrescritos. \*Descobertas recentes onde a proteína não foi ligada a um tipo celular específico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1.10 Experimento

O grupo experimental contou com 50 camundongos machos da linhagem C57BL/6 e 70 machos F1 (C57Bl/6 x ADCx32), com idade de 8 semanas ao início do experimento, os quais apresentam deleção do gene da conexina 32 no cromossomo X (genótipo Cx32<sup>Y/-</sup>).

Para o grupo de animais normais foram usados 50 camundongos C57BL/6 adquiridos do biotério da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS/POA/RS). Os animais foram divididos em grupos segundo a Tabela 2.

Para o grupo de animais KO foram utilizados 70 camundongos machos F1 (genótipo Cx32<sup>Y/-</sup>) provenientes do biotério do Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Esses animais foram divididos em grupos segundo a Tabela 2.

Os tratamentos consistiram de uma única injeção de 5 µl de BE 0,1% em SS 0,9% e na sisterna basal e 1 µl de BE 0,1% em SS 0,9% no terço médio do nervo ciático direito. Os animais controles receberam o mesmo volume de SS 0,9%. Os camundongos foram submetidos à eutanásia nos tempo de 24 e 48 horas, 3, 7, 15, 21 e 30 dias. Todos os camundongos foram perfundidos com fixadores diferentes, de acordo com o processamento posterior das amostras (Tabela 2).

#### 1.10.1 Camundongos

Os animais utilizados no experimento foram criados em sala adaptada à criação de camundongos, em gaiolas de polipropileno de 30x20x13 cm, dispostas em prateleiras em sala climatizada com temperatura de 21 °C com variação de 2 °C. A cama utilizada foi maravalha de pinus autoclavada, trocada três vezes por semana. Os animais receberam ração comercial para camundongos (CR1 – Nuvital) e água filtrada *ad libitum*.

Os camundongos F1 (C57Bl/6 x ADCx32) usados no experimento foram produzidos no Biotério do VPT da FMVZ da USP, criados e mantidos de acordo com as normas de biossegurança para animais geneticamente modificados nível 1. Esses animais foram obtidos através do cruzamento de camundongos com genótipos predefinidos por exame de PCR. Foram acasalados machos da linhagem C57Bl/6 (genótipo Cx32<sup>Y/+</sup>) com uma ou duas fêmeas AdCx32 homozigotas (genótipo Cx32<sup>-/-</sup>), as quais possuem deleção do gene da conexina 32.



Como o gene da conexina 32 está localizado no cromossomo X, todos os filhotes machos F1 provenientes desses acasalamentos apresentaram o genótipo Cx32<sup>Y/-</sup>.

**Tabela 2 - Distribuição do número de animais em cada grupo experimental e a relação dos tempos de eutanásia após injeção. BE: brometo de etídio e SS: solução salina**

Tempo/ Tratamento	Processamento	24hrs		48hrs		3dias		7dias		15dias		21dias		30dias		-	Total
		SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE		
Microscopia	Normais	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	-	40
Eletrônica	KO Cx32	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	28
Parafina	Normais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	5	10
	KO Cx32	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	28
Congelação	Normais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
	KO Cx32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	14
Total																120	

Os camundongos KO foram mantidos em gaiolas de polipropileno medindo 30x20x13cm, com filtro na parte superior da tampa, servindo como uma barreira extra e evitando o contato dos animais com o meio externo como insetos, por exemplo. As gaiolas ficaram dispostas em prateleiras de perfilado metálico em salas com sistema de ar condicionado central, com 20 a 30 trocas totais de ar por hora e controle de temperatura e umidade relativa do ar, 22±2 °C e 55±10%, respectivamente. A iluminação foi artificial, controlada por “timer”, com ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Ração comercial para camundongos (CR1 – Nuvital) e água filtrada e autoclavada foram oferecidas *ad libitum* durante todo o experimento. As condições de alojamento e manejo dos animais estão de acordo com as normas éticas internacionais, em especial com aquelas do National Research Council (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Os animais destinados ao experimento ficaram no setor experimental do biotério, o qual consta de salas climatizadas como as descritas anteriormente, separados em lotes com no máximo 5 animais por caixa.

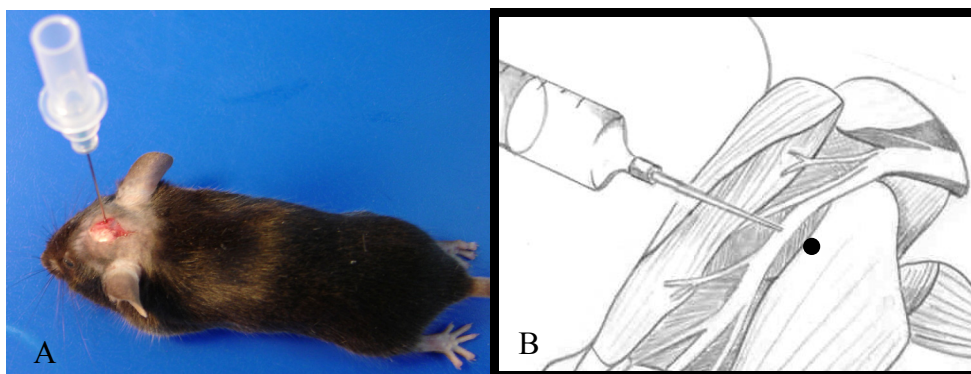
### 1.10.2 Cirurgias

Para a cirurgia os animais foram anestesiados com xilazina e quetamina na dose de 4 mg/kg e 20 mg/kg respectivamente, por via intraperitoneal. Foi realizada tricotomia na região da cabeça, atrás dos olhos, entre as orelhas e na região lateral da coxa direita iniciando 1 cm abaixo da coluna vertebral.

Foi realizada uma incisão na pele, na altura da linha média do crânio, com 1,5 cm e uma perfuração no crânio, caudal ao tentório do cerebelo (Figura 10A), com auxílio de uma

agulha 25x08 limitada por uma pinça a 2 mm do final do bisel. A injeção foi realizada com seringa Hamilton<sup>®</sup> de 10 µl. Foram injetados 5 µl de BE ou SS na cisterna basal.

Na porção média da coxa do mesmo animal foi realizada outra incisão com 1,5 cm e os músculos da região foram divulsionados com o auxílio de uma pinça, para localização do nervo ciático. Um ponto de sutura foi dado em um feixe de fibras do músculo que recobre o ciático para demarcar o local da injeção. Com o auxílio de uma seringa Hamilton<sup>®</sup> de 10 µl, foi injetado 1µl no terço médio do nervo ciático, imediatamente abaixo do local da realização do ponto no músculo (Figura 10B). Os animais foram acompanhados até se recuperarem totalmente da anestesia e foram tratados com morfina por até 48 horas de 8 em 8 horas com dose de 1,5 mg/kg por via subcutânea.



**Figura 10** - Local da injeção nos camundongos, no encéfalo (A) caudal ao tentório do cerebelo; (B) no nervo ciático localizado com o ponto de sutura representado por um círculo preto (Adaptado de: (RIET-CORREA, 2001).

### 1.10.3 Perfusão

Para se obter uma adequada preservação do tecido nervoso foi realizada a perfusão dos animais; esses receberam intraperitonealmente uma dose letal de Thiopental<sup>®</sup> (5 mg). Quando abolido o reflexo podal, os animais foram imobilizados com auxílio de esparadrapo em uma placa de parafina. A abertura da cavidade torácica foi realizada com tesoura, fazendo-se um corte originado na região umbilical seguido de incisão das costelas lateralmente ao esterno para rebater cranialmente o plastrão. Uma agulha (13x04), de ponta romba a 1 cm da base, conectada ao sistema de perfusão, foi introduzida no ventrículo esquerdo, o qual foi pinçado no terço ventral contra a agulha para fixar a mesma e evitar o refluxo. No início da perfusão, realizou-se uma pequena incisão no átrio direito para permitir a drenagem do sangue. Cada animal foi perfundido inicialmente com cerca de 40-50 ml de solução salina 0,9% com 0,01 M de EDTA tamponado como anticoagulante (pH 7,4), para a retirada do sangue. Após a passagem desse volume pelo animal, a bomba foi desligada e o equipo foi

trocado do frasco da solução salina para o frasco que continha o fixador. No caso do material destinado à microscopia eletrônica utilizou-se o glutaraldeído 2,5%. Nos materiais destinados ao congelamento o fixador utilizado foi paraformaldeído 4%. No material destinado ao processamento com parafina somente foi utilizada perfusão-lavagem com solução salina 0,9% a 0,01M de EDTA. O sistema de perfusão contou com bombas peristálticas com velocidade regulável, específicas para a perfusão de camundongos (MasterFlex - Cole-Parmer).

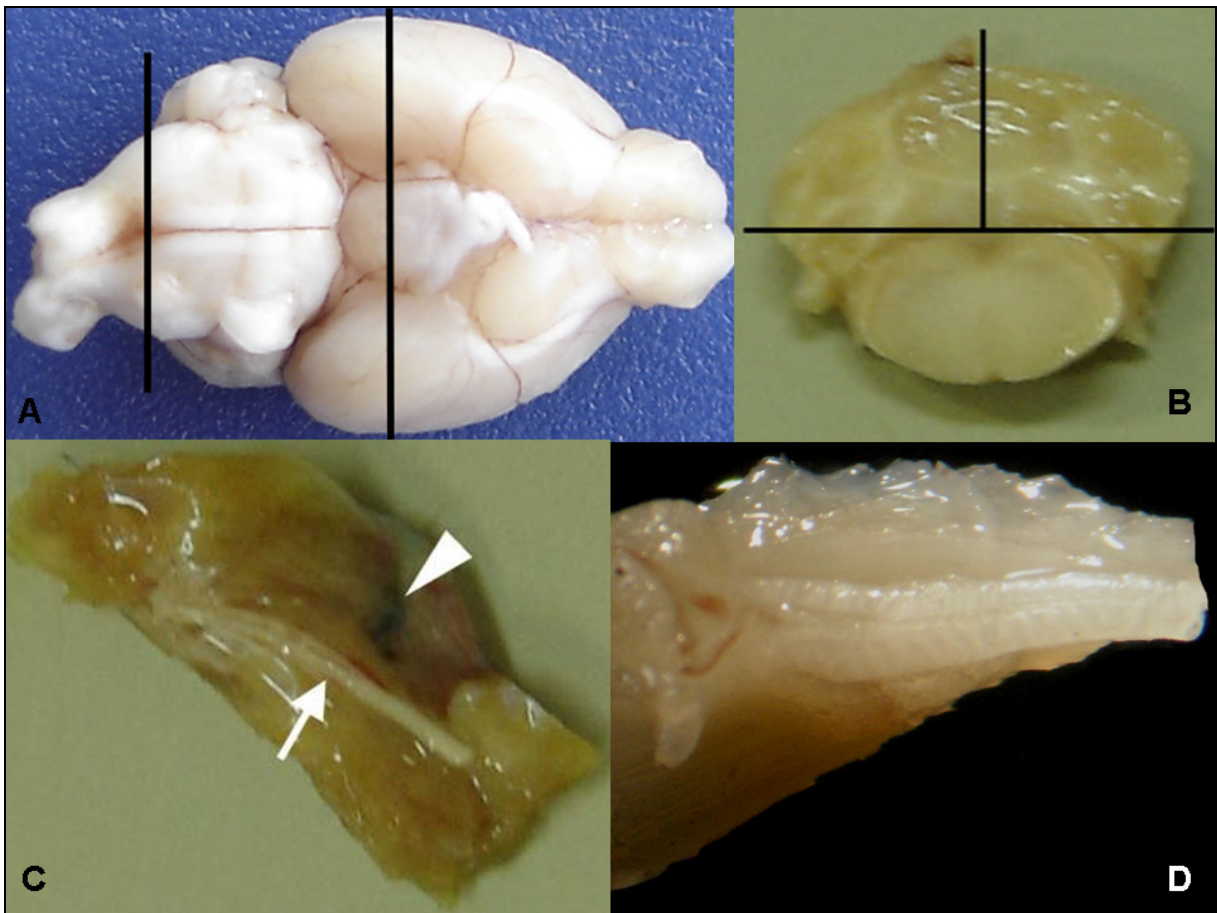
O material destinado ao estudo ultra-estrutural foi colhido e incluído em resina, para obtenção de cortes semifinos e ultrafinos. O material destinado aos estudos histológicos foi colhido e processado para obtenção de cortes em parafina e de congelamento, permitindo desta forma a realização de reações de imunistoquímica utilizando anticorpos específicos. A distribuição das amostras esta descrita na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

#### 1.10.4 Processamento

O estudo ultra-estutural foi realizado em amostras de dois animais de cada grupo, os animais foram perfundidos com 50 ml de glutaraldeído 2,5% após a lavagem com solução de salina e EDTA. O material do encéfalo foi obtido de cortes de ponte e cerebelo localizados na região da injeção. As estruturas tomadas como referência, para a realização dos cortes transversais estão representadas na Figura 11A. Foram retirados dois cortes transversais, com 1 mm, cada um dividido em 3 fragmentos, um correspondente à ponte e dois correspondentes ao cerebelo esquerdo e direito (Figura 11B). O nervo ciático foi dividido em duas partes exatamente no local da injeção, para realização de cortes transversais. Os nervos ciáticos foram emblocados juntamente com uma faixa de musculatura adjacente a fim de facilitar a manipulação e corte do material (Figura 11C), formando uma pirâmide na qual o ponto de local de injeção ficou no ápice (Figura 11D).

Os animais que foram submetidos à eutanásia para a colheita de material para processamento em parafina foram perfundidos somente com 40-50 ml de solução salina a 0,9% com 0,01M de EDTA tamponado (pH 7,4). Depois de serem retirados da caixa craniana, os encéfalos foram mantidos durante, no máximo 24 horas, em solução de Metacarn (60% clorofórmio, 30% metanol e 10% ácido acético), transferidos para uma solução de álcool a 70% e incluídos em parafina segundo o procedimento padrão. O mesmo procedimento foi realizado com os ciáticos. Os encéfalos foram incluídos a partir do terço final dos hemisférios até o início da ponte, para a obtenção de cortes coronais. Em algumas amostras, em que o

fragmento do nervo ciático era evidente, o fragmento de músculo foi retirado no momento do emblocamento.



**Figura 11** - Indicação dos cortes que foram realizados no material do SNC (A e B) e do SNP (C e D) para processamento em parafina e congelamento (A e C) e microscopia eletrônica (B e D). As linhas pretas representam os cortes realizados no material. O ponto de sutura (cabeça de seta) auxiliou na localização da injeção no ciático (seta).

Após a perfusão com solução de salina a 0,9% com 0,01M de EDTA tamponado (pH 7,4), as amostras de encéfalos, destinadas a cortes de congelamento foram imediatamente incluídas em meio para congelamento Tissue-tek<sup>®</sup> (Sakura). Os blocos foram congelados em vapor de nitrogênio líquido e mantidos em gelo seco, para posterior armazenagem a -70 °C até serem cortados em criostato para a realização de imunohistoquímica e imunofluorescência. Foram obtidos cortes de regiões equivalentes às do material incluído em parafina. Os cortes para congelamento foram realizados em criostato Cryocut 1800 Reichert-Jung a temperatura de 25 °C negativos.

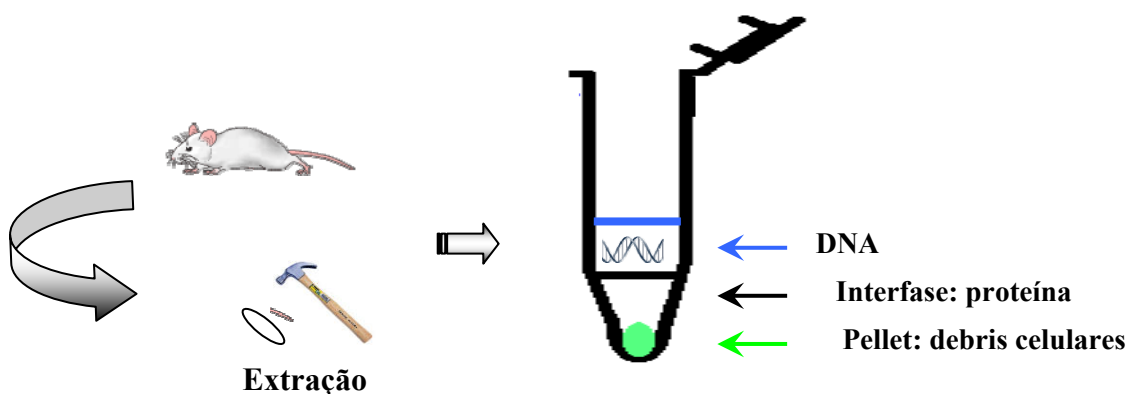
### 1.11 PCR

De cada animal foi obtida uma amostra de cauda com aproximadamente 1 cm de comprimento para extração de DNA. O método de extração consistiu basicamente em macerar

a cauda coletada aumentando, assim, a área de contato entre a enzima (proteínase K) e as células para se extrair o DNA em uma solução concentrada de acetato de sódio (Figura 12). Este método permitiu a rápida genotipagem de camundongos de linhagens de interesse utilizados nos experimentos.

A coleta da cauda dos camundongos foi realizada com uma tesoura desinfetada em álcool iodado entre um animal e outro; as caudas dos camundongos foram cortadas com um tamanho aproximadamente de 1 cm na diagonal, embrulhadas em papel alumínio e identificadas com papel interno, numerado a lápis e armazenadas imediatamente em garrafa térmica com nitrogênio líquido, e após conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a análise.

Para a extração do DNA a cauda foi macerada com martelo em placa metálica no gelo e colocada em um tubo plástico de 2 ml identificado, juntamente com 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise com proteínase K (50  $\mu\text{l}$  de proteínase K para 3 ml de tampão). A incubação foi feita durante 2 horas em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  ou over-night a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa. Na retirada foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (sem proteínase K) à amostra e homogeneizados em vortex, e deixados à temperatura ambiente durante 15 minutos. Na etapa seguinte o tubo foi centrifugado durante 20 minutos, a 10000 r.p.m. a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrífuga refrigerada (5810R – Eppendorff); o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de onde foram aspirados cerca de 250  $\mu\text{l}$ , evitando-se pegar a interfase ou o precipitado (Figura 12)



**Figura 12 - Esquema que ilustra alguns passos de extração de DNA. O fragmento da cauda é macerado com o auxílio de uma placa gelada. No tubo é mostrada a disposição do material após a centrifugação.**

No novo tubo com o sobrenadante foi adicionado 2 vezes o volume do sobrenadante de etanol 100% gelado, juntamente com 10% do volume do sobrenadante de acetato de sódio 3M gelado. Os tubos foram mantidos no gelo durante o procedimento, e foram homogeneizados suavemente até o aparecimento da medusa. O material voltou à centrífuga durante 10 minutos a 6000 r.p.m. a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após essa etapa o sobrenadante foi desprezado por inversão. Foram

adicionados 500µl de etanol 70% para a remoção do sal que fica em excesso no material (isso facilitou a solubilização do pellet no final do procedimento). Uma nova etapa de centrifugação foi realizada durante 10 minutos a 6000 r.p.m. a 4°C, e o sobrenadante foi desprezado por inversão. Os tubos ficaram invertidos para tirar o excesso do etanol e secar o pellet, procedimento realizado na própria bancada. O pellet foi re-suspendido em TE (Tris/EDTA), na quantidade de 200µl, para se incubar as amostras em banho a 65°C durante 30 minutos facilitando a solubilização do pellet, que foi homogeneizado para posterior quantificação.

Na etapa de quantificação foi determinada a concentração e a razão A260/280, para isso o DNA foi diluído na proporção de 5 µl de DNA em 95 µl (1:20) de TE, os 100 µl foram colocados em uma cubeta, esta inserida no Biofotômetro onde foi anotada a razão (em torno de 1,8) e a concentração em ng/µl. Para a elaboração da reação de PCR as amostras foram diluídas para 100ng/µl com TE. Para a reação de PCR foi preparado um “mix”, conforme descrito na Tabela 3.

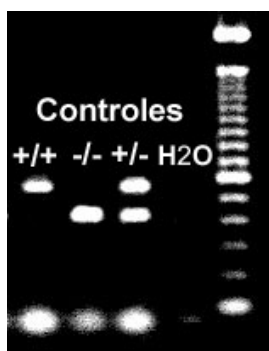
Foram utilizados na reação de PCR três primers (Tabela 4), que podem resultar em uma ou duas bandas dependendo da seqüência dos genes em que eles se alinharam. O número de bandas depende da homozigose ou heterozigose dos animais.

**Tabela 3 - Especificações das quantidades e produtos que foram utilizados para a formulação do *mix* a ser utilizado na reação de PCR.**

MIX	Quantidade
DNA (50 - 100ng/µl)	1 – 2 µl
Tampão (10X)	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,6 µl
dNTPs (2,5mM)	1,6 µl
Primer KO WT NEO (10pMol/µl)	1 µl
Primer KO WT 3 (10pMol/µl)	1 µl
Primer KO NEO 3 (10pMol/µl)	1 µl
DMSO	1 µl
Taq Platinum	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	11,6 µl
<b>Total</b>	<b>22 µl</b>

**Tabela 4 - Seqüência dos *primers* utilizados na reação de PCR.**

Primer	Seqüência
Cx32 KO-WT-NEO 5'	5' – CCATAAGTCAGGTGTAAAGGAGC – 3'
CX32 KO-NEO 3'	5' – ATCATG CGAAACGATCCTCATCC – 3'
CX32 KO-WT 3'	5' – AGATAAGCTGCAGGGACCATAGG – 3'



**Figura 13** - Amostra de gel com os genótipos dos camundongos esperados e com os controles dos genótipos e da reação.

## 1.12 Histoquímica

A partir dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  em lâminas para a realização das colorações de hematoxilina-eosina, luxol-fast-blue nos cortes de encéfalo e ciáticos e azul de toluidina, para evidenciação de mastócitos somente nos ciáticos.

Para a realização da técnica de hematoxilina e eosina, as lâminas passaram por um processo de desparafinização composta de duas passagens em xilol, sendo a primeira na estufa a 60 °C por 30 minutos e a segunda a temperatura ambiente por 5 minutos. O processo de hidratação consistiu de passagens em concentrações decrescente de álcoois, finalizando com água corrente por 1 minuto. Após a hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina por 50 segundos e voltaram para água corrente para oxidação da hematoxilina por 2 a 4 minutos. A coloração pela eosina por 20 segundos foi precedida de uma passagem em álcool absoluto. Após o final da coloração a desidratação foi realizada com passagens em 3 alcoóis absolutos. A clarificação foi realizada com uma passagem em xilol. Outra passagem em xilol preparou a lâmina para a montagem, com resina sintética (Entellan<sup>®</sup> Merck) e lamínula sobre o corte.

### 1.12.1 Luxol Fast Blue para mielina

Na técnica de luxol-fast-blue, as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas até álcool 95%, e posteriormente colocadas no corante Luxol Fast Blue a 0,1% na estufa a 60 °C, por 24 horas. Após essa etapa as lâminas foram passadas em álcool 95% para retirada do excesso de corante, e assim preparadas para a diferenciação que foi realizada com carbonato de lítio a 0,05% por 20 segundos e uma passagem em álcool 70%. A contra coloração foi realizada com Nuclear Fast Red a 0,1% por 2 minutos, posteriormente as lâminas foram desidratadas clarificadas e montadas com meio de montagem sintético (Entellan<sup>®</sup> Merck).

### 1.12.2 Azul de Toluidina para mastócitos

Para a realização da técnica de azul de toluidina as lâminas foram desparafinizadas e hidratadas como descrito acima. As lâminas foram mergulhadas em azul de toluidina a 0,1% por 1 minuto, lavadas em água corrente e desidratadas, clarificadas e montadas.

### 1.13 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada em cortes realizados a partir de blocos de parafina. Foram utilizados três anticorpos primários: anti-GFAP (DakoCytomation; cód. Z0334; 1:5000), anti-CNPase (Abcam; cód. ab6319; 1:1500), anti-S100 (DakoCytomation; cód. Z0311; 1:1000).

A partir dos blocos de parafina foram obtidos cortes histológicos de 5  $\mu$ m em lâminas silanizadas para a realização de reações de imunoistoquímica e imunofluorescência. As lâminas passaram por um processo de desparafinização composta de duas passagens em xilol, sendo a primeira na estufa a 60 °C por 30 minutos e a segunda à temperatura ambiente por 5 minutos. O processo de hidratação constituiu de passagens em álcool, sendo a primeira em álcool absoluto por 1 minuto, após mais 30 segundos em um segundo álcool absoluto. A seguir, as lâminas ficaram por 30 segundos em álcool 96 °GL e mais um minuto em álcool 70 °GL. A etapa se completa com água corrente por 3 minutos e água destilada por mais 1 minuto.

Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado peróxido de hidrogênio a 10 volumes (3%), em duas etapas de 10 minutos, onde o peróxido foi pingado sobre os cortes. Após essa etapa os cortes foram lavados por 10 minutos em água corrente e por mais 1 minuto em água destilada.

Para diminuição da coloração de fundo foi utilizada uma solução de albumina, composta de 1 clara de ovo em 100 ml de água destilada, onde o corte ficou por 15 minutos. Para o bloqueio dos sítios inespecíficos foi utilizada uma solução de leite em pó desnatado a 5% diluído em PBS por 30 minutos. Para retirar o excesso foi utilizada água corrente por 3 minutos e água destilada por mais 1 minuto.

Os cortes ficaram em PBS por 5 minutos sendo preparados para a incubação com anticorpo primário, que foi diluído em PBST nas diluições citadas acima. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário durante 2 horas em câmara úmida a 37 °C. Após a incubação os cortes foram lavados em PBST por duas vezes durante 5 minutos cada. O anticorpo secundário foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente (25 °C). O excesso de anticorpo foi lavado com PBS, seguido de dois banhos em PBS de 5 minutos. O



complexo estreptavidina-peroxidase foi incubado por 30 minutos a 25 °C, com quantidade suficiente para cobrir o corte. Foi utilizado um kit LSAB-Peroxidase (DakoCytomation, cod. K0690) com o anticorpo secundário e o complexo estreptavidina-peroxidase. O excesso foi lavado com o mesmo processo da lavagem anterior.

Para a revelação da reação foi utilizado DAB (diaminobenzidina) por 2 minutos, diluído (DAB 72 mg: PBS 120 ml: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1,2 ml). A revelação foi parada em água destilada, seguida de uma lavagem em água corrente por 3 minutos. A contra coloração foi feita com hematoxilina de Mayer por 15 minutos. O corte foi lavado em água corrente para retirar o excesso de hematoxilina por 15 minutos, após, as lâminas foram secadas à temperatura ambiente por toda a noite e no dia seguinte clarificadas e montadas com resina sintética (Entellan© - Merck).

No caso de marcação dupla, após a revelação com DAB e a lavagem com água corrente por 3 minutos a lâmina foi colocada em PBST por duas vezes de 5 minutos. Após essa etapa, sobre os cortes era colocado o segundo anticorpo primário, e o protocolo era repetido com a utilização de um kit LSAB-Fosfatase (DakoCytomation, cod. K0689). A revelação foi realizada com Permanent Red (DakoCytomation, cod. K0680).

#### **1.14 Imunofluorescência**

A imunofluorescência foi realizada em cortes de parafina obtidos previamente ao início do protocolo.

Foram utilizados dois anticorpos primários para a realização da marcação dos cortes de encéfalo e em cortes de nervo ciático, anti-conexina 32 (Santa Cruz Biotechnology, cod. sc-7258) e anti-conexina 43 (ZYMED, cod. 71-0700), e o anticorpo anti-OSP (Abcam, cod. ab7474) somente nos encéfalos. Todos os anticorpos foram utilizados em diluições de 1:100. Os cortes foram desparafinizados e hidratados conforme o protocolo de imunistoquímica. Uma lavagem com PBST por 10 minutos precedia a incubação com anticorpo primário, diluído em PBST (1:100), que ocorreu durante toda a noite. No dia seguinte foi realizada uma lavagem em PBST, preparando o corte para incubação com anticorpo secundário (kit LSAB; DAKO Cytomation) por 2 horas à temperatura ambiente. O excesso era lavado com PBST por duas lavagens de 5 minutos. O anticorpo terciário anti-rabbit fluorescente (FITC) diluído em PBST (1:100), era incubado por 2 horas, no escuro. O excesso de anticorpo foi retirado por uma lavagem em PBST, no escuro, para posterior montagem em meio aquoso Vectashild® (Vector Laboratories), também no escuro. A vedação da lamínula foi feita com esmalte (base

incolor). As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com filtro FITC (Olympus BX-41).

### 1.15 Microscopia eletrônica

O material colhido com 1-2 mm de espessura, foi fixado em glutaraldeído a 2,5% em PBS (pH7,2-7,4) por 48 horas a 4°C, lavado em PBS (três trocas) e posteriormente imerso em solução de tetroxido de ósmio a 1% em PBS por 4 horas a 4°C. Os fragmentos foram lavados em água bidestilada a 4°C por 10 minutos (duas trocas). Como terceiro fixador e contrastante foi utilizado acetato de uranila a 0,5% em solução aquosa, no qual os fragmentos permaneceram por 16 horas a 4°C. A seguir, os fragmentos foram lavados em água bidestilada, duas lavagens de 5 minutos a 4°C.

A desidratação das amostras foi feita pela passagem em série crescente de acetona a 30%, 50%, 70% e 90% (15 minutos em cada concentração). A acetona 90% foi substituída por acetona pura, onde as amostras permaneceram por 45 minutos, em 3 banhos de 15 minutos cada.

Após desidratados e imersos em acetona, as amostras foram transferidas para soluções constituídas por diferentes proporções de acetona e resina de inclusão, respectivamente: 2:1, 1:1 e 1:2, nas quais permaneceram por uma hora em frascos abertos, à temperatura ambiente, em agitador automático, e transferidas para resina pura por uma hora a 37°C. A resina de inclusão foi preparada da seguinte maneira: Resina epon 27 ml, DDSA – 23 ml, DMP-30, 1 ml. A polimerização da resina foi realizada em estufa a 60 °C por 72 horas.

Os cortes semifinos foram obtidos em ultra-micrótomo (Leica Reichert Supernova) com 0,5-1 µm de espessura, colocados sobre lâminas histológicas e corados com azul de toluidina a 0,5% em bórax a 2,5% (pH 11) por 1 minuto em chapa quente a 80°C. A partir desses cortes eram selecionadas as áreas de lesão para a realização dos cortes ultra-finos. Através da trimagem dos blocos eram realizados os cortes ultra-finos com 60 nm de espessura. Os cortes ultra-finos foram colocados em grades de cobre de 200 *mesh* cobertas com membranas de formvar, e contrastados com solução de citrato de chumbo por 5 minutos à temperatura ambiente. Os cortes ultra-finos foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D) com sistema de captura de imagens integrado (MegaView).

## RESULTADOS

Os camundongos usados nos experimentos foram observados diariamente e, após a completa recuperação da anestesia, não demonstraram alterações neurológicas: movimentavam-se, alimentavam-se e interagiam entre si de modo normal.

### 1.16 PCR

No PCR dos animais utilizados no experimento foi visualizada uma única banda de 414 pb, que representa o genótipo dos animais homocigotos KO para a Cx32 (machos Cx<sup>Y/-</sup>) (Figura 14).

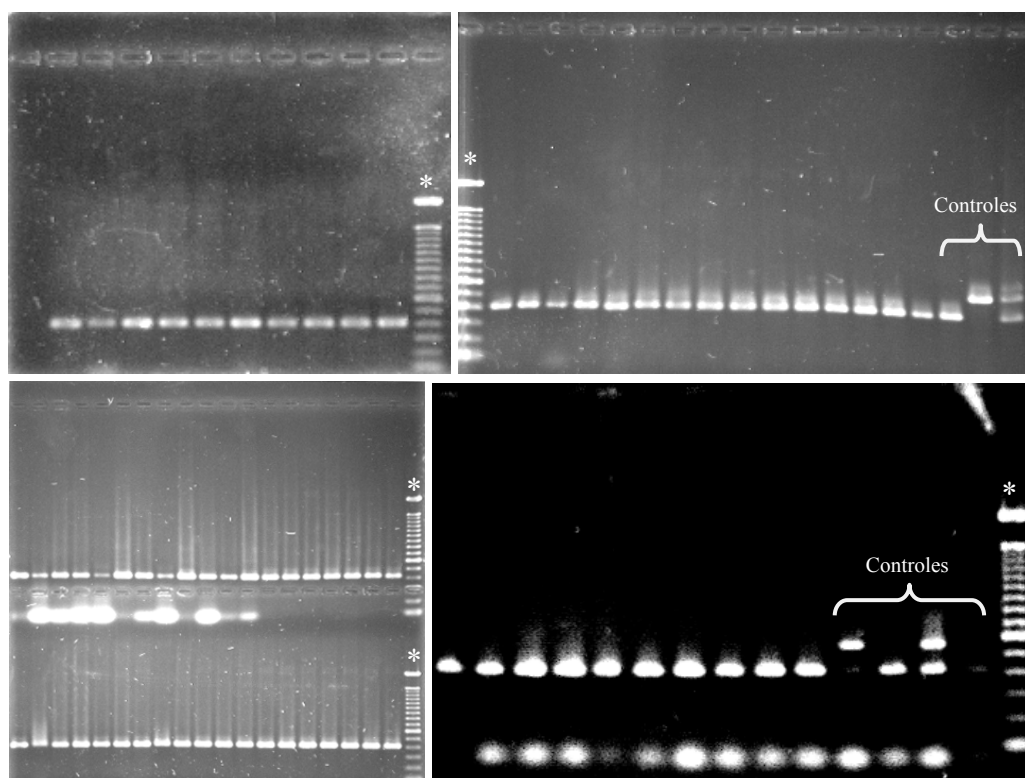


Figura 14 - Resultado do PCR dos animais utilizados no experimento e os controles dos genótipos e da reação e escala de DNA (\*).

### 1.17 Histoquímica

#### 1.17.1 Encéfalos

Foram realizadas lâminas de animais que não receberam tratamento (BE ou SS), para controle da morfologia do tecido (Figura 15 A e B).

As lesões induzidas pela injeção de 5 µl de BE 0,1% eram discretas e localizadas ao longo do trajeto da agulha, e se expandiam radialmente para formar lesões de contornos ovais.

Estavam localizadas em áreas centrais ou ventrais da ponte. Em alguns casos, havia lesão no ponto de injeção, no cerebelo.

A fim de facilitar a descrição e a interpretação das lesões, os resultados das colorações de HE e LFB serão apresentados simultaneamente para camundongos normais e KO (Tabela 5). As diferenças serão anotadas. Um resumo das principais alterações observadas na cisterna basal após a injeção de BE é apresentado no APÊNDICE G.

**Tabela 5 – Quantificação das lesões encontradas nos encéfalos de acordo com as lâminas analisadas.**

Tempo/ Tratamento	Normais		24 hrs		48 hrs		3 dias		7 dias		15 dias		21 dias		30 dias	
	--	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE
Lesões																
Hemorragia	0	0	3	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemossiderina	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	2	2	1	1
Esgongiose	0	1	3	3	3	3	3	3	1	3	2	2	1	2	1	1
Lesão Cística	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0*	1	0	1	0	2
Aumento da Celularidade	0	3	0	0	2	1	2	2	2	3	2	3	1	2	1	2
Neo-vascularização	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
Axônios tumefeitos	0	0	2	3	2	3	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0
Reação Astrocítaria	0	1	0	1	1	2	1	2	2	3	1	2	1	2	1	2

0 - ausente; 1 – leve (0-30%); 2 – moderada (30-60%); 3 – acentuada (60-100%).\*somente uma amostra foi analisada.

#### 1.17.1.1 Quinze dias (camundongos normais)

- BE: havia esgongiose acentuada com gliose local e distribuição irregular das células no tecido (Figura 16A). No LFB a esgongiose era evidenciada entre os feixes de axônios fracamente corados (Figura 16B).

#### 1.17.1.2 Vinte e quatro horas

As lesões com duração de 24 horas eram marcadas pela presença de hemorragia, tanto nos animais tratados com solução salina como nos animais tratados com brometo de etídio (Figura 17A). Esferóides axonais podiam ser visualizados ao longo do trajeto da agulha.

- SS (solução salina): no trajeto da agulha havia focos de hemorragia, com áreas discretas de esgongiose. No LFB eram visualizados feixes e fibras entre as áreas de esgongiose.

- BE (brometo de etídio): nas áreas de lesão induzida pelo BE havia focos de hemorragia, com áreas focalmente extensas de esgongiose (Figura 17B). No LFB eram visualizadas fibras mielinizadas em meio à esgongiose, algumas destas fibras apresentavam mielina mais fina (Figura 17D).

#### 1.17.1.3 Quarenta e oito horas

- SS: havia áreas de hemorragia no trajeto da agulha, principalmente no cerebelo. Na ponte foi possível observar focos de hemorragia circundados por espongiose. No LFB os feixes estavam irregularmente entremeados com células e a espongiose no trajeto da agulha.

- BE: no trajeto da agulha havia hemorragia envolvida por extensa área de espongiose (Figura 18A e B). Não havia coloração para mielina pelo LFB na área da lesão (Figura 18C).

#### 1.17.1.4 Três dias

- SS: no trajeto da agulha havia hemorragia. Na área afetada pela introdução da agulha, a espongiose era local, discreta a moderada, com presença de esferóides axonais. No LFB, no local da espongiose, as fibras estavam afastadas e fracamente coradas.

- BE: no trajeto da agulha havia áreas focais de hemorragia circundadas por muitas células com núcleo basofílico (micróglia), e espongiose moderada a acentuada com presença de esferóides axonais (Figura 19A e B). No LFB não havia coloração para mielina no centro da lesão e, na periferia, as fibras estavam esparsas devido à espongiose (por edema) (Figura 19C).

#### 1.17.1.5 Sete dias

- SS: a espongiose era moderada e confinada à área onde a agulha foi introduzida; havia aumento da celularidade ao longo do trajeto da agulha. Estas células estavam em meio às fibras mielinizadas visualizadas no LFB.

- BE: a espongiose era acentuada e localizada ao redor do ponto de introdução e no trajeto da agulha (Figura 20A e B), separando os feixes de fibras não visualizadas no LFB (Figura 20C). Em meio à espongiose havia aumento discreto da celularidade.

#### 1.17.1.6 Quinze dias

- SS: havia aumento da celularidade, localizada no trajeto da agulha. Na região ventral da ponte podia ser visualizada espongiose discreta, próximo à meninge.

- BE: havia espongiose acentuada com gliose focal (Figura 21A e B) e neovascularização. No LFB a espongiose era evidenciada entre os feixes de axônios fracamente corados (Figura 21C).

#### 1.17.1.7 Vinte e um dias

- SS: na ponte havia leve aumento da celularidade ao longo do trajeto da agulha. No LFB essas células eram visualizadas em meio aos feixes de mielina.

- BE: na ponte havia áreas de neo-vascularização com espongiose leve (Figura 22A e B), e aumento do número de células, identificadas como astrócitos e micróglia. No LFB a espongiose separava os axônios remielinizados, que estavam entremeados a astrócitos e micróglia (Figura 22C).

#### 1.17.1.8 Trinta dias

- SS: nos encéfalos dos animais submetidos à eutanásia 30 dias após receberem a injeção de solução salina havia espongiose mínima e macrófagos contendo hemossiderina no trajeto da agulha. No LFB eram visualizadas células alongadas em meio aos feixes de axônios mielinizados.

- BE: havia lesões císticas na ponte, com aumento da celularidade, notadamente no trajeto da agulha (Figura 23A e B). Na coloração de LFB havia locais onde a mielina e os axônios estavam entremeados a células com núcleo claro e vesiculoso (astrócitos) (Figura 23C).

### 1.17.2 Nervos ciáticos

As lesões induzidas pela injeção de 1 µl de BE no nervo ciático dos camundongos do experimento eram de extensão variável e envolviam as fibras mielinizadas, o perineuro e o epineuro. As alterações consistiram de desmielinização segmentar seguida de remielinização, e de degeneração walleriana decorrente do traumatismo da injeção. Os resultados obtidos através do HE, LFB e azul de toluidina serão apresentados conjuntamente (Tabela 6). O resumo das principais alterações observadas no nervo ciático dos camundongos injetados com BE são apresentados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

Fragmentos de nervo ciático de animais normais não submetidos a tratamento foram estudados com as mesmas técnicas citadas acima (Figura 24A e C)

#### 1.17.2.1 Quinze dias (camundongos normais)

- BE: havia infiltrado inflamatório focalmente extenso no perineuro. Em um dos feixes havia aumento de celularidade. No LFB havia bainhas de mielina fracamente coradas (Figura

25A). No azul de toluidina observavam-se raros mastócitos no perineuro, bem como entre as fibras mielinizadas.

**Tabela 6 - Quantificação das lesões encontradas nos nervos ciáticos de acordo com as lâminas analisadas.**

Tempo/ Tratamento	Normais		24 hrs		48 hrs		3 dias		7 dias		15 dias		21 dias		30 dias	
	--	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE
Lesões																
Infiltrado perineuro	0	2	2	3	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	2
Aumento da celularidade	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0*	0	2	1	1	0	1
Câmaras de digestão	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0*	0	1	0	0	0	0
Mastócitos perivasculares	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mastócitos no perineuro	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	2	1	1	1	2	2
Mastócitos nos fascículos	1	1	1	1	1	0	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1
Marcação para S100	0	1	1	0	1	2	0	1	2	1	1	2	0*	2	1	1

0 - ausente; 1 - leve (0-30%); 2 - moderada (30-60%); 3 - acentuada (60-100%). \*somente uma amostra foi analisada.

#### 1.17.2.2 Vinte e quatro horas

- SS: Nos fascículos eram visualizados raros focos de aumento da celularidade e raras câmaras de digestão. No perineuro havia infiltrado inflamatório moderado a acentuado. Raros mastócitos eram vistos no perineuro e no interior dos fascículos.

- BE: Havia intenso infiltrado inflamatório no perineuro (Figura 26A e B). Nos fascículos o infiltrado inflamatório localizava-se entre as fibras, onde havia rara presença de mastócitos (Figura 26D).

#### 1.17.2.3 Quarenta e oito horas

- SS: Os fascículos apresentavam alguns focos de aumento da celularidade, com algumas câmaras de digestão. Havia raros mastócitos no perineuro e nos fascículos.

- BE: havia moderado infiltrado inflamatório no perineuro. Nos fascículos havia raros focos de aumento de celularidade e câmaras de digestão. Raros mastócitos eram vistos no perineuro.

#### 1.17.2.4 Três dias.

- SS: No perineuro havia focos de moderado infiltrado inflamatório. Nos fascículos eram visualizados pequenos focos com número de células aumentado e algumas câmaras de digestão. A presença de mastócitos estava localizada no perineuro, com algumas células desgranuladas no interior dos fascículos.

- BE: No perineuro havia moderado a acentuado infiltrado inflamatório focalmente extenso (Figura 27A e B). Nos fascículos havia alguns focos de aumento de celularidade e raras câmaras de digestão (Figura 27A e D).

#### 1.17.2.5 Sete dias

- SS: Entre as fibras mielinizadas havia aumento do número de células em focos longitudinais, com presença de raras câmaras de digestão. Moderado número de mastócitos eram vistos entre as fibras mielinizadas e no perineuro onde a maioria estava desgranulada.

- BE: No perineuro havia infiltrado inflamatório acentuado, neste infiltrado havia muitos mastócitos, localizados na periferia dos vasos.

#### 1.17.2.6 Quinze dias

- SS: Havia raras células inflamatórias infiltradas no perineuro, algumas destas células inflamatórias eram mastócitos visualizados pelo azul de toluidina. Raros mastócitos eram vistos entre as fibras mielinizadas.

- BE: Havia infiltrado inflamatório focalmente extenso no perineuro (Figura 28A). Em um dos feixes havia aumento de celularidade (Figura 28B). Havia raros mastócitos no perineuro, bem como entre as fibras mielinizadas (Figura 28C).

#### 1.17.2.7 Vinte e um dias

- SS: Entre as fibras mielinizadas havia aumento da celularidade, em raras fibras havia câmaras de digestão. Presença leve a moderada de mastócitos entre as fibras mielinizadas e no perineuro. Alguns dos mastócitos estavam desgranulados.

- BE: No interior dos feixes havia alguns focos de aumento discreto de celularidade (Figura 29A e B). Havia focos de mastócitos entre as fibras e no perineuro, alguns estavam desgranulados (Figura 29C).

#### 1.17.2.8 Trinta dias

- SS: em alguns fascículos havia leve infiltrado inflamatório no perineuro. Em alguns locais do perineuro havia mastócitos, essas mesmas células eram encontradas raramente entre as fibras mielinizadas.

- BE: havia aumento da celularidade localizado com as células alinhadas entre as fibras mielinizadas. Havia infiltrado inflamatório leve no perineuro. Entre as fibras mielinizadas havia alguns mastócitos.



## 1.18 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi de grande auxílio para a visualização das lesões localizadas no encéfalo dos camundongos tratados, porém quando a técnica foi aplicada nos nervos ciáticos, a marcação das células de Schwann através do anticorpo anti-S100 foi variável, inconstante e de distribuição aleatória, diferentemente da obtida pelo anticorpo anti-GFAP para astrócitos e do anticorpo anti-CNPase para oligodendrócitos no encéfalo.

### 1.18.1 Encéfalos

Na marcação para CNPase e GFAP, foi verificada a morte de oligodendrócitos e de astrócitos nas lesões iniciais, e a posterior recuperação destas células no processo de reparo das lesões (Tabela 5). Tecidos de camundongos que não foram tratados foram utilizados como controle morfológico (Figura 15C).

#### 1.18.1.1 Quinze dias (camundongos normais)

- BE: Havia a marcação de processos astrocitários hipertróficos (GFAP) ao longo da lesão. A marcação para CNPase era fibrilar na periferia (Figura 16C).

#### 1.18.1.2 Vinte e quatro horas

- SS: havia marcação inconstante por GFAP e CNPase no trajeto da agulha e na área de espongirose.

- BE: Não foi observada marcação para GFAP e CNPase no centro das lesões espongióticas induzidas pelo BE (Figura 17C).

#### 1.18.1.3 Quarenta e oito horas

- SS: havia marcação astrocitária, principalmente no trajeto da agulha e na área de espongirose.

- BE: não era detectada marcação para GFAP e CNPase no centro das lesões. A marcação era identificada na periferia das lesões (Figura 18D).

#### 1.18.1.4 Três dias

- SS: a marcação astrocitária estava confinada a poucas células que acompanhavam o trajeto da agulha. A marcação para CNPase tinha um aspecto indefinido em alguns pontos, contrastando com a marcação fibrilar normal.

- BE: no centro da lesão não havia marcação para GFAP ou CNPase; na periferia poucos astrócitos estavam marcados (Figura 19D).

#### 1.18.1.5 Sete dias

- SS: A marcação para GFAP era moderada no trajeto da agulha e moderada a acentuada na área de espongirose. A marcação para CNPase estava normal.

- BE: A reação astrocitária era discreta e difusa na área de espongirose, caracterizada pela presença de finos processos celulares marcados por GFAP. Não havia marcação oligodendrocítica através da CNPase no centro da lesão onde a espongirose era mais evidente (Figura 20D).

#### 1.18.1.6 Quinze dias

- SS: A reação astrocitária estava restrita à área de espongirose e mais intensamente ao redor de pequenas áreas císticas formadas ao longo do trajeto da agulha. A marcação para CNPase não era evidente ao redor das áreas císticas.

- BE: A reação astrocitária estava presente na área de espongirose e estava mais evidente na área ao redor da espongirose. Não havia marcação para CNPase no trajeto da agulha e no foco de lesão (Figura 21D).

#### 1.18.1.7 Vinte e um dias

- SS: a reação astrocitária era discreta e confinada ao trajeto da agulha com algumas células expressando GFAP na periferia desse trajeto. A marcação para CNPase era normal, embora ausente na lesão provocada pela agulha.

- BE: havia reação astrocitária moderada a acentuada no trajeto da agulha, bem como nas áreas de espongirose. Na espongirose e no trajeto da agulha havia focos sem marcação para oligodendrócitos (Figura 22D)

#### 1.18.1.8 Trinta dias

- SS: a reação astrocitária limitava-se à cicatriz glial induzida pelo trajeto da agulha. A marcação dos oligodendrócitos obedecia ao padrão normal, e era detectada inclusive em meio à reação astrocitária.

- BE: a reação astrocitária era leve, porém estava mais distribuída no local da lesão, principalmente ao redor das lesões císticas, onde não havia marcação para CNPase (Figura 23D). A reação à CNPase era conspícua adjacente ao tecido normal.

### 1.18.2 Ciáticos

Na marcação para S-100 foi evidenciada a presença das células de Schwann nos fascículos do nervo ciático dos animais tratados com BE e SS e de animais não tratados (Figura 24B). Uma variação ampla da marcação estava presente não importando o tratamento aplicado (Tabela 6). O anticorpo para S-100 não possui uma especificidade celular eficaz e, portanto, a marcação não fica restrita às células de Schwann, neste caso estando presente também em axônios. Em todas as lâminas analisadas havia marcação axonal. Tal variação é evidente nas Figura 25B, Figura 26C, Figura 27C, Figura 28D e Figura 29D.

## 1.19 Imunofluorescência

### 1.19.1 Cx32

Não houve marcação em encéfalo ou ciático dos animais KO para conexina 32. A marcação foi visualizada somente em tecidos controles (fígado e pulmão) nos animais normais (Figura 30A e B).

### 1.19.2 Cx43

Foi realizada em encéfalos dos animais tratados com BE e SS, e em animais que não receberam qualquer tratamento. Nos animais que não receberam tratamento a marcação estava restrita às células endoteliais, leptomeninges e células de Purkinje no cerebelo.

Nas áreas de lesão, a marcação era discreta nas áreas centrais, ao longo do trajeto da agulha e marcada em lesões a partir dos 15 dias nos animais inoculados com BE (Figura 31A e B).

### 1.19.3 OSP

A marcação para a proteína específica para oligodendrócitos estava restrita aos oligodendrócitos presentes nos locais de lesão, e foi verificada a partir dos sete dias pós-injeção na periferia das lesões (Figura 32A e B).

## 1.20 Microscopia eletrônica

Para efeitos de facilitar a descrição, os achados dos cortes semifinos e ultra-finos serão realizados e ilustrados conjuntamente, nos camundongos normais e KO (Tabela 7 e 8).

### 1.20.1 Encéfalos

**Tabela 7 - Quantificação das lesões ultra-estruturais encontradas nos encéfalos de acordo com as amostras analisadas.**

Tempo/ Tratamento	Lesões	Genótipo	24 hrs		48 hrs		3 dias		7 dias		15 dias		21 dias		30 dias	
			SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE
Edema intracelular e extracelular	Normais		3	3	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
	KO Cx32		3	3	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0	0	0
Desmielinização	Normais		0	0	0	0	0	2	0	3	0	1	0	0	0	0
	KO Cx32		0	0	0	0	0	2	0	3	0	1	0	0	0	0
Polimorfonucleares Monócitos	Normais		0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0
	KO Cx32		0	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0
Células de Schwann	Normais		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	KO Cx32		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Remielinização	Normais		0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	3	
	KO Cx32		0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	3	

0 - ausente; 1 – leve (0-30%); 2 – moderada (30-60%); 3 – acentuada (60-100%).\*somente uma amostra foi analisada.

#### 1.20.1.1 Vinte e quatro horas

- SS: Era visualizada área de espongirose discreta ao longo do trajeto da agulha, devido à presença da solução injetada e do edema das células afetadas traumaticamente.

- BE: Área de espongirose discreta expandia do trajeto da agulha, devido ao edema celular, desaparecimento de células gliais do centro da lesão e expansão do espaço extracelular (Figura 33A e B). Processos astrocitários esparsos com feixes compactados de filamentos gliais eram observados em meio ao espaço extracelular expandido.

#### 1.20.1.2 Quarenta e oito horas

- SS: Não foram observados sinais de desmielinização segmentar, porém, havia lesão axonal traumática ao longo do trajeto da agulha.

- BE: Alteração celular tóxica dos oligodendrócitos era observada pela retração dos processos celulares e afastamento das bainhas de mielina. As organelas mais afetadas eram as mitocôndrias e o sistema citocavitário, que estavam expandidos por edema. Astrócitos não eram visualizados no centro das lesões.

#### 1.20.1.3 Três dias

- SS: A espongiose causada pela solução injetada começa a diminuir e com ela a separação das fibras mielinizadas afetadas.

- BE: São visualizados os primeiros axônios desmielinizados. Nos animais normais a retirada dos detritos celulares e de mielina é realizada por um número reduzido de fagócitos (Figura 34A). Raros processos de células gliais intoxicadas eram observados na periferia das lesões (Figura 34B). Nos camundongos KO são observados alguns polimorfonucleares em atitude usualmente assumida por fagócitos mononucleares, i.é, células em estreito contato com axônios em processo de desmielinização (Figura 35A e B).

#### 1.20.1.4 Sete dias

- SS: Pouca ou nenhuma alteração tecidual era detectada.

- BE: No centro das lesões há restos celulares e de mielina entremeados com poucos fagócitos. A presença de axônios desmielinizados é conspícua. Na periferia das lesões, finos processos astrocitários se estendem na direção dos axônios desprovidos de bainhas. Raras células de Schwann são observadas nos camundongos normais e estão ausentes nos camundongos KO.

#### 1.20.1.5 Quinze dias

- SS: Tecidos sem alterações.

- BE: Os processos astrocitários são conspícuos na periferia das lesões e a espessura desses processos é maior. É detectada a presença de escassos processos oligodendrogliais relacionados com axônios desmielinizados, ou pobremente mielinizados com bainhas muito finas e ainda não compactadas, na interface com o tecido normal, não afetado pelo BE. São observadas raras células de Schwann em contato com axônios nos camundongos normais. Não são observadas nos camundongos KO. (Figura 36A, B e C).

#### 1.20.1.6 Vinte e um dias

- SS: Tecidos sem alterações

- BE: Nos normais são observadas raras células de Schwann nas lesões. Uma fina área de processos oligodendrogliais, caracterizados pela presença de microtúbulos, em contato com os axônios finamente remielinizados foi visualizada. Esses processos estavam entremeados com processos astrocitários, caracterizados pela presença de feixes de filamentos de GFAP.

Nas áreas de confluência dessas células gliais, a deposição de lamelas de mielina, clara evidência de remielinização, era detectada (Figura 37A).

Nos camundongos KO havia presença de bainhas de mielina finas entre alguns vasos sanguíneos (Figura 37B). Não são detectadas células de Schwann nas lesões.

#### 1.20.1.7 Trinta dias

- SS: Tecidos sem alterações.

- BE: Há evidências de remielinização em todas as lesões, notadamente na periferia das mesmas. Não foram visualizadas células de Schwann ao redor de vasos sanguíneos ou em localizações subpiais nos camundongos KO enquanto que são ocasionais nos camundongos normais.

#### 1.20.2 Ciáticos

**Tabela 8 - Quantificação das lesões ultra-estruturais encontradas nos nervos ciáticos de acordo com as amostras analisadas.**

Tempo/ Tratamento	Lesões	Genótipo	24 hrs		48 hrs		3 dias		7 dias		15 dias		21 dias		30 dias		
			SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	SS	BE	
Edema Intra e Extracelular		Normais	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		KO Cx32	1	1	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Degeneração walleriana		Normais	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		KO Cx32	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fagócitos		Normais	0	0	0	0	1	1	1	1	0	2	0	1	0	0	0
		KO Cx32	0	0	0	0	1	1	1	1	0	2	0	1	0	0	0
Remielinização		Normais	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3
		KO Cx32	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3
Compactação da bainha		Normais	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3
		KO Cx32	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	3	3
Tomacula		Normais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	3
		KO Cx32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	3	3
Fibras de Remak		Normais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2
		KO Cx32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	2

0 - ausente; 1 – leve (0-30%); 2 – moderada (30-60%); 3 – acentuada(60-100%).

#### 1.20.2.1 Vinte e quatro horas

- SS: Há edema intra-fascicular mínimo e presença de células inflamatórias no epineuro.

- BE: Há sinais de intoxicação das células de Schwann, caracterizados por edema das organelas e início de rejeição das bainhas de mielina.

#### 1.20.2.2 Quarenta e oito horas

- SS: É detectada evidência de degeneração walleriana, com número variável de câmaras de digestão ao longo de fibras.

- BE: Há edema focal do endoneuro com presença de vesiculação das bainhas de mielina e presença de células inflamatórias (Figura 38A e B). Há células de Schwann intoxicadas que rejeitaram suas bainhas (Figura 39A). Há degeneração walleriana de fibras.

#### 1.20.2.3 Três dias

- SS: Há sinais de degeneração walleriana de fibras e de infiltrado inflamatório no perineuro e epineuro.

- BE: Muitos axônios mostram a bainha irregularmente vesiculada. Poucos fagócitos são visualizados entre as fibras. A degeneração walleriana de raras fibras é representada pelas câmaras de digestão.

#### 1.20.2.4 Sete dias

- SS: São visualizadas células de Schwann proliferadas formando as bandas de Büngner.

- BE: Há axônios com bainhas muito finas produzidas por células de Schwann proliferadas (Figura 39B). Os restos de mielina são removidos por fagócitos mononucleares.

#### 1.20.2.5 Quinze dias

- SS: Fascículos sem alterações.

- BE: Há remielinização de axônios, caracterizada pela deposição de algumas lamelas de mielina mal compactadas. Há células de Schwann supranumerárias em contato com esses axônios. Os internodos reparados de mielina são mais curtos do que os normais.

#### 1.20.2.6 Vinte e um dias

- SS: Fascículos sem alterações.

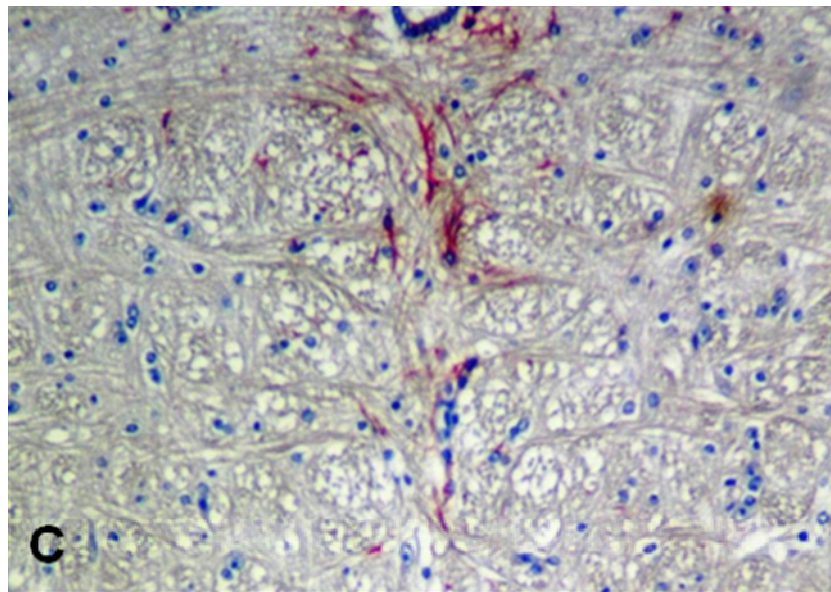
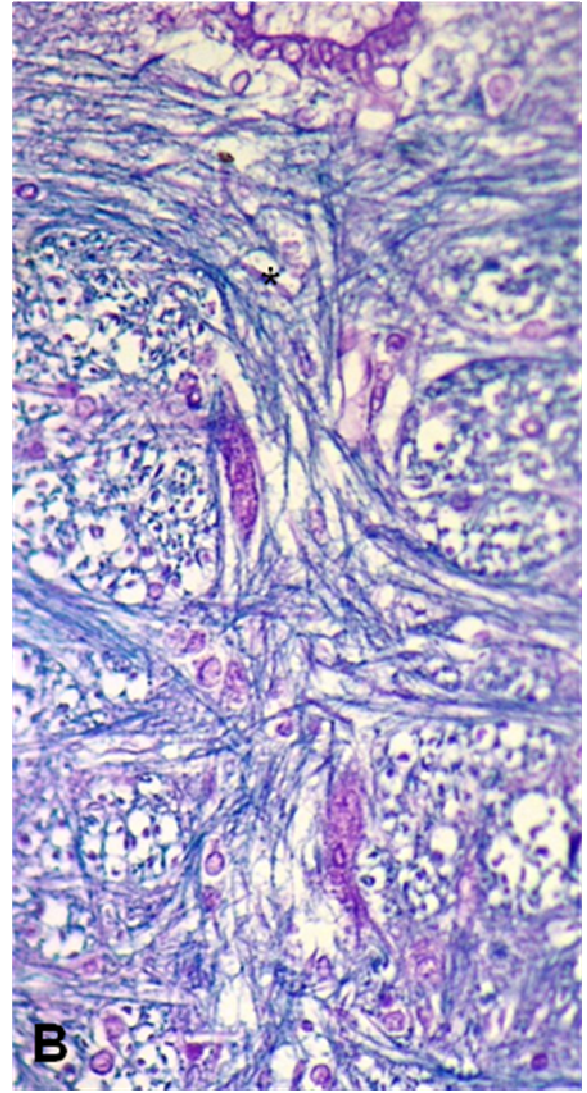
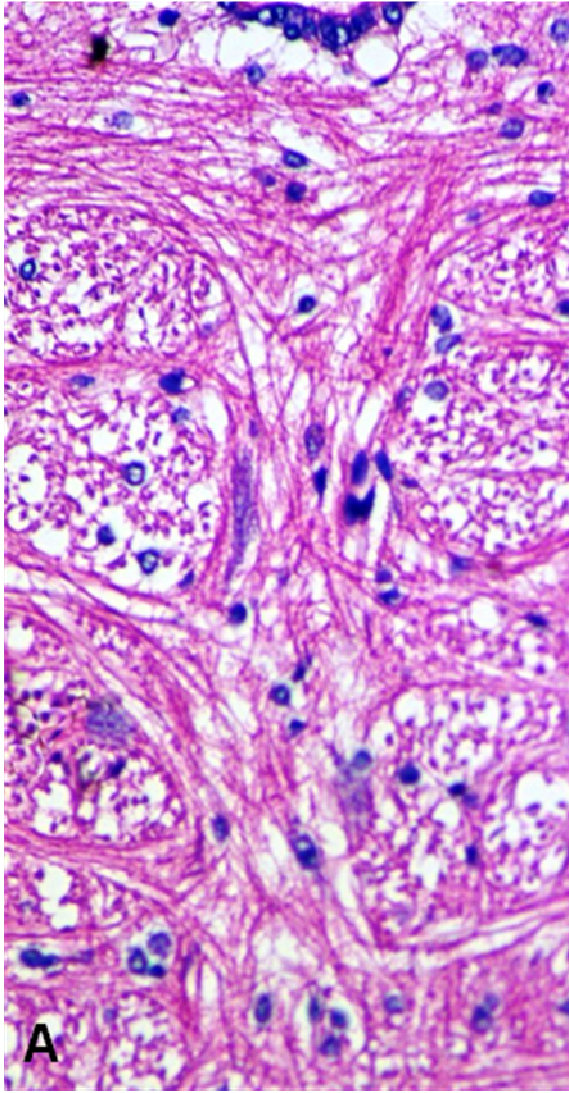
- BE: Os axônios possuem bainha de mielina fina e medianamente compactada com alças redundantes (Figura 40A).

#### 1.20.2.7 Trinta dias

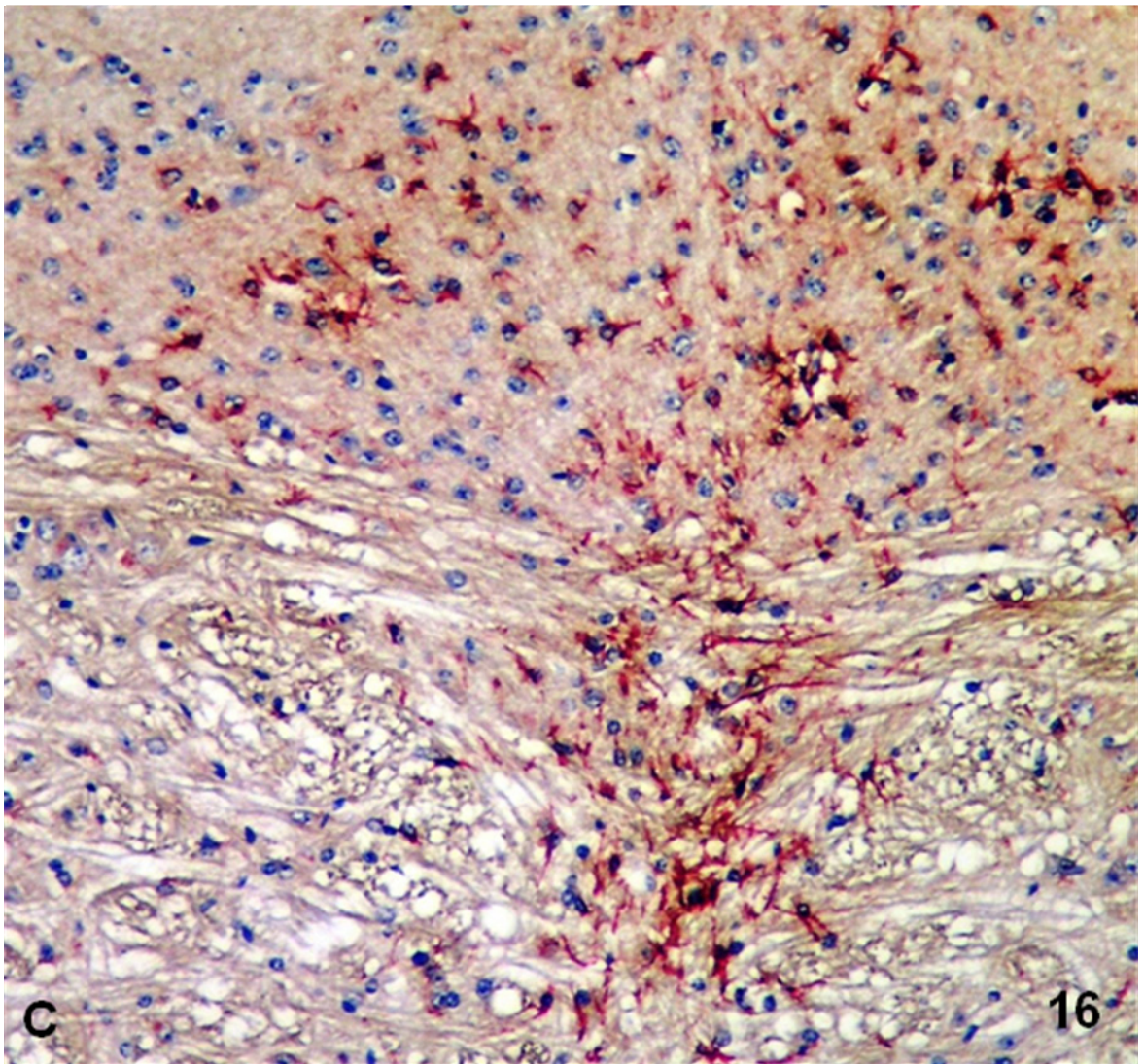
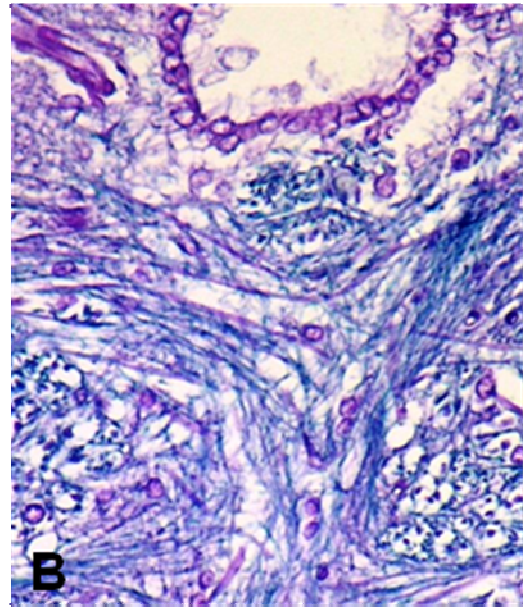
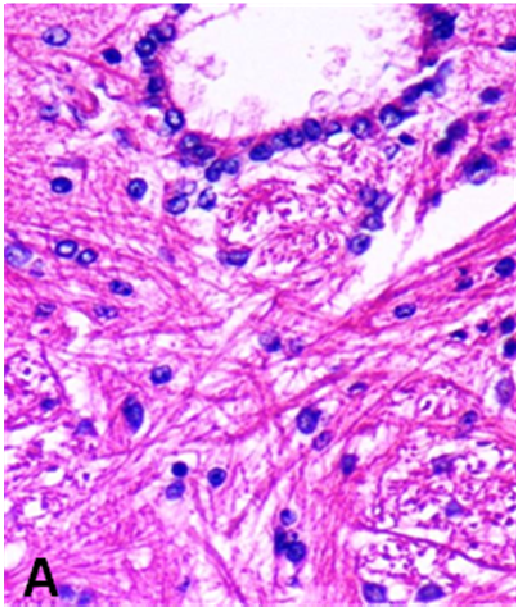
- SS: Fascículos sem alterações.

- BE: Nos camundongos as bainhas finas dos axônios remielinizados mostram compactação maior do que aos 21 dias, com alças redundantes. Nos KO, além dessas alterações são visualizadas numerosas fibras de Remak (Figura 41A e B e Figura 40B).

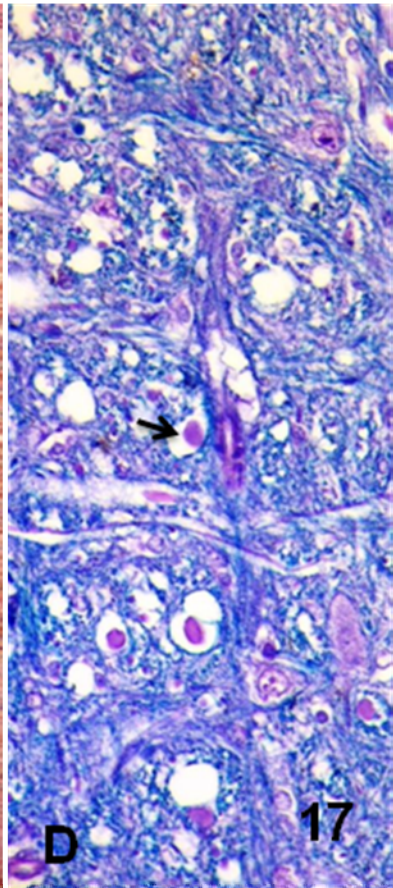
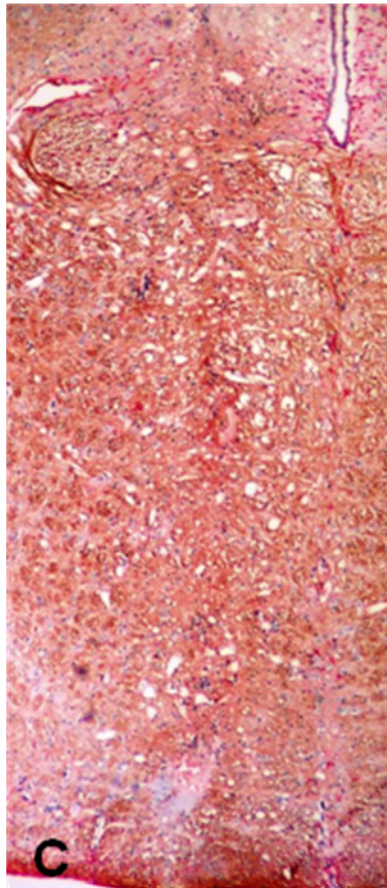
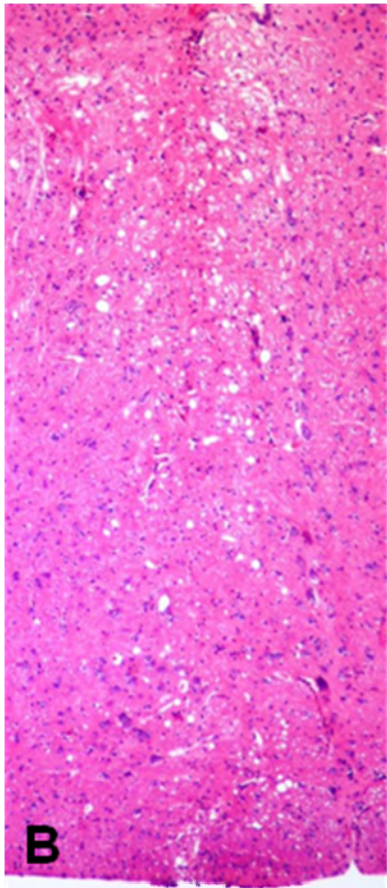
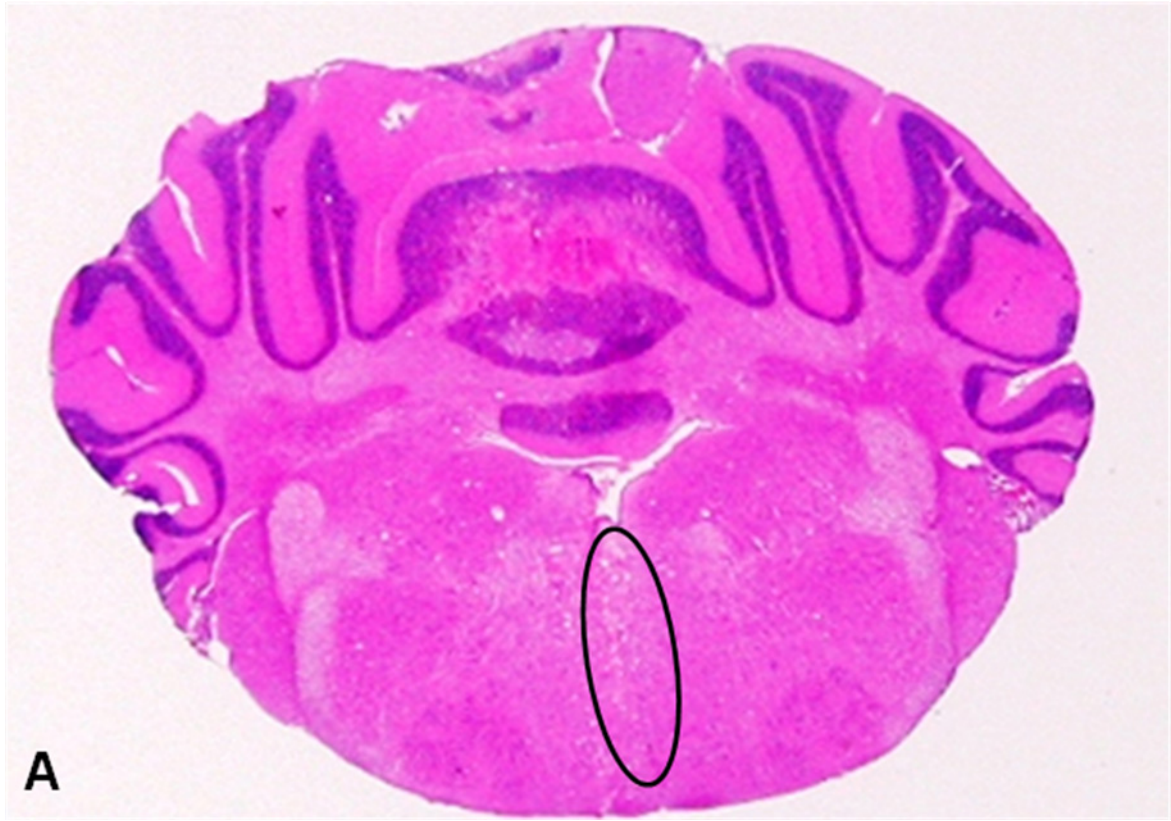




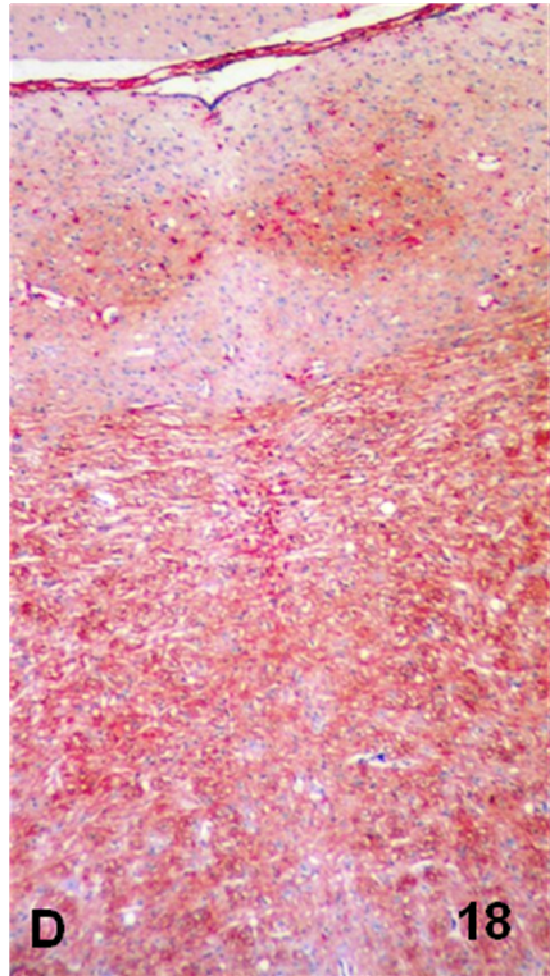
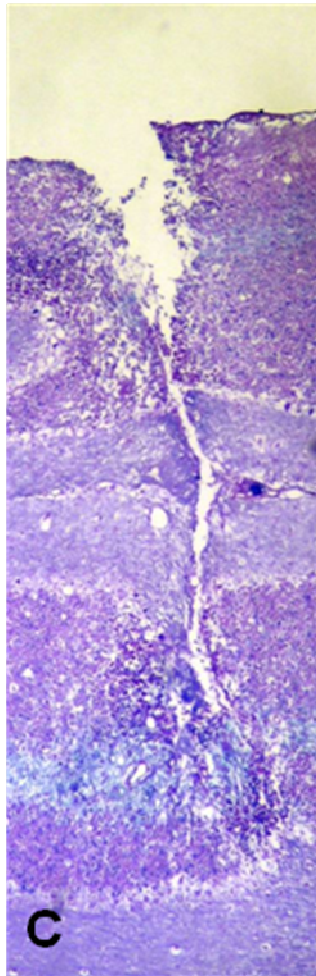
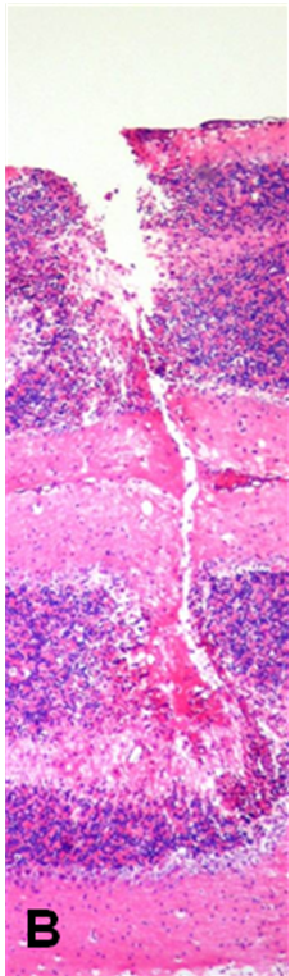
**Figura 16 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos normais injetados com BE e submetidos à eutanásia 15 dias pós-injeção. A. H&E: distribuição irregular das células no tecido. Obj.: 40X. B. LFB: coloração pálida da mielina na área de lesão (\*). Obj.: 40X. C. IHQ: marcação de processos astrocitários hipertróficos ao longo da lesão. anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X.**



**Figura 17 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 24 horas na ponte. Observe áreas de hemorragia no local de introdução da agulha, no cerebelo e na ponte. B. H&E: espongiose discreta no aspecto medial da ponte. Obj.: 10X. C. IHQ: marcação astrocitária para GFAP na periferia da área de espongiose. Processos oligodendrogliais estão marcados na área de espongiose; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 10X. D. LFB: escassa coloração para mielina é detectada na área de lesão onde são vistos esferóides axonais (seta). Obj.: 20X.**

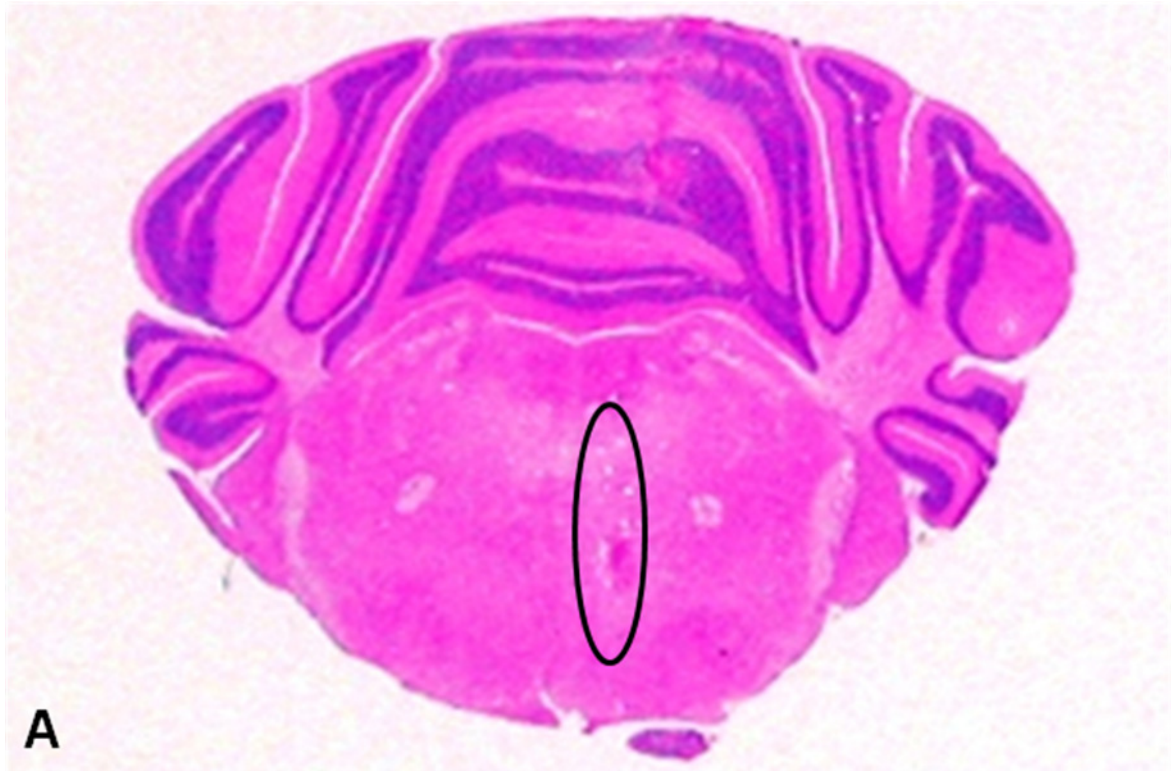


**Figura 18 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 48 horas na ponte. B. H&E: extensa lesão traumática é observada no trajeto da agulha no cerebelo. Obj.: 10X. C. LFB: evidencia a lesão do cerebelo ao longo do trajeto da agulha. Obj.: 10X. D. IHQ: a marcação astrocitária acompanha o trajeto da agulha antes da área de espongiões onde há escassa marcação para CNPase; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 20X.**

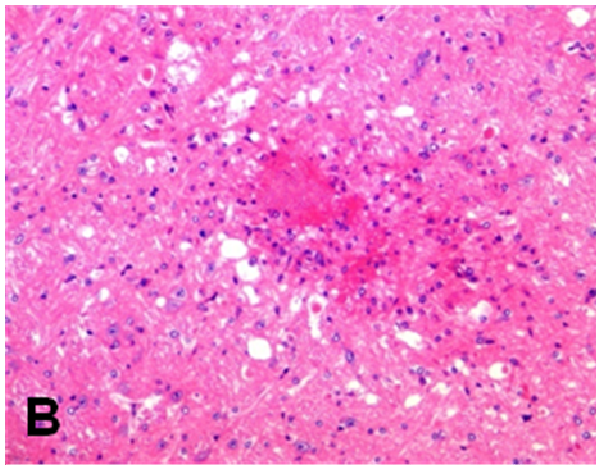


**Figura 19 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 3 dias na ponte. B. H&E: área de espongiose com balões axonais com região central hemorrágica. Obj.: 40X. C. LFB: não são observadas bainhas de mielina na região central da lesão. Obj.: 40X. D. IHQ: marcação astrocitária para GFAP na periferia da área de lesão; marcação difusa por CNPase adjacente às áreas centrais da lesão; anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra-coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.: 40X.**

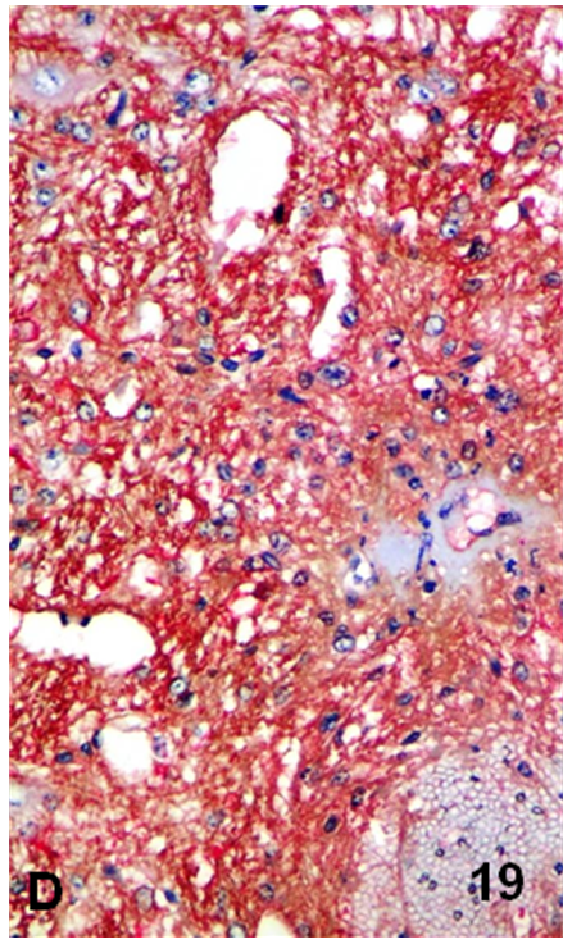




**A**

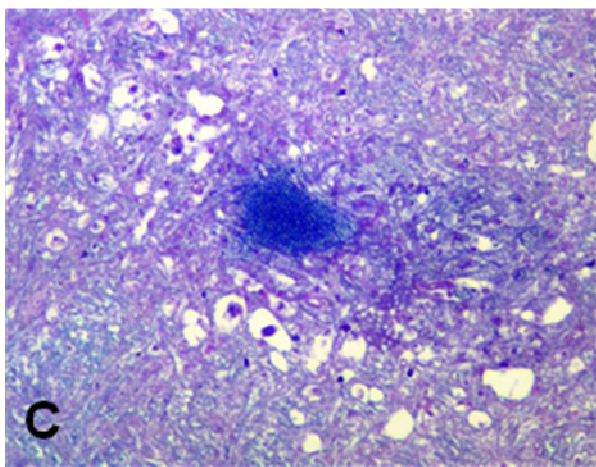


**B**



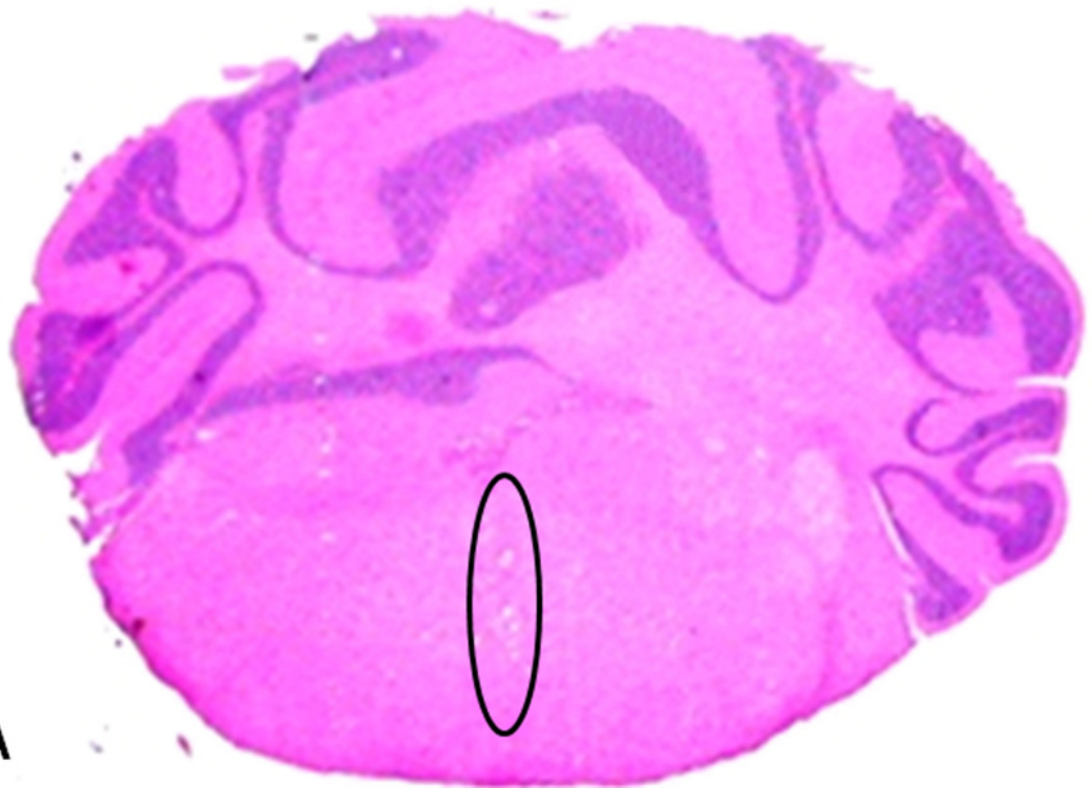
**D**

**19**

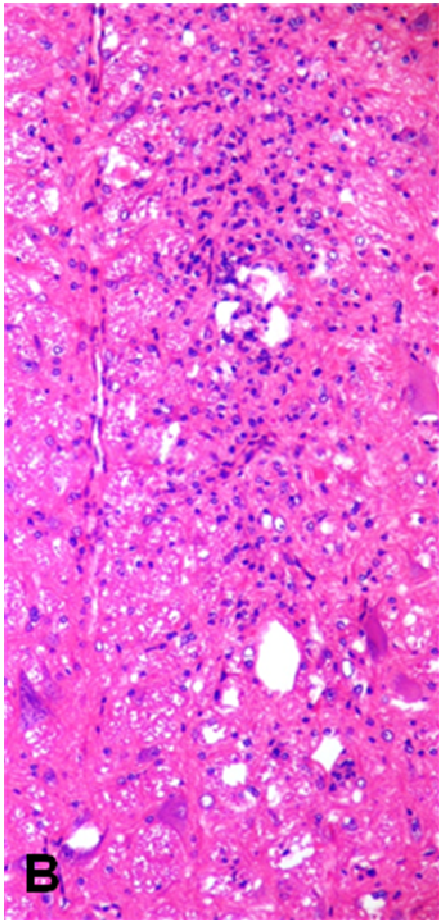


**C**

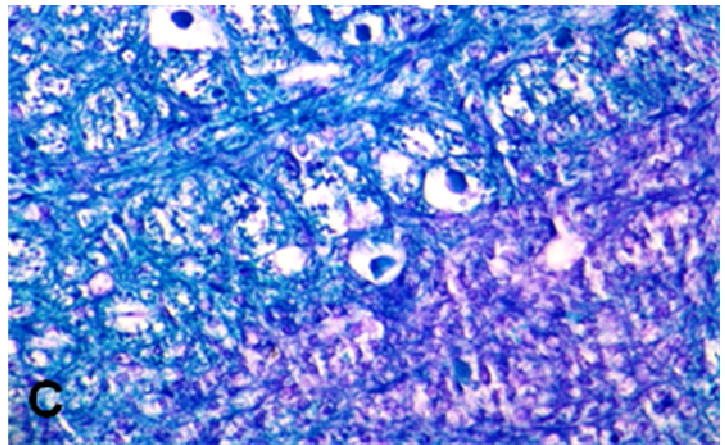
**Figura 20 – Aspectos de microscopia de luz das lesões observadas em camundongos KO para Cx 32. A. Submacro: 0 – localização de lesão de 7 dias na ponte. B. H&E: moderado aumento da celularidade de localização medial e espongiose discreta. Obj.: 20X. C. LFB: área ventral direita sem coloração para mielina. Obj.: 40X. D. IHQ: marcação por GFAP nas porções dorsais da lesão e marcação residual por CNPase nas áreas mediais. anti-GFAP (vermelho; complexo estreptavidina-biotina-fosfatase) e anti-CNPase (marrom; complexo estreptavidina-biotina-peroxidase). Contra coloração: hematoxilina de Mayer. Obj.:40X.**



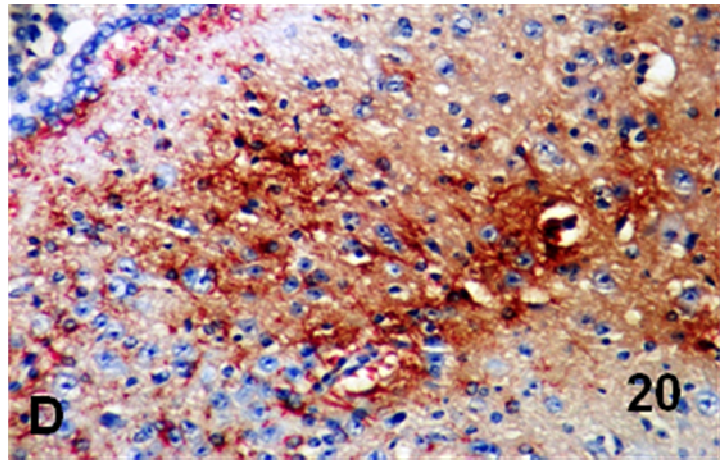
**A**



**B**



**C**



**D**

20